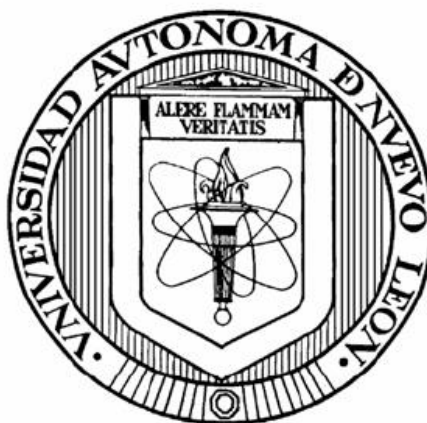


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD ANTIFUNGICA *in vitro* DE EXTRACTOS CRUDOS Y FORMULADOS DE
***Euphorbia tirucalli*.**

Por

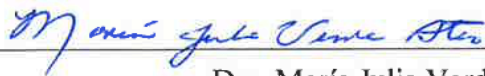
MICHEL STÉPHANE HEYA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA

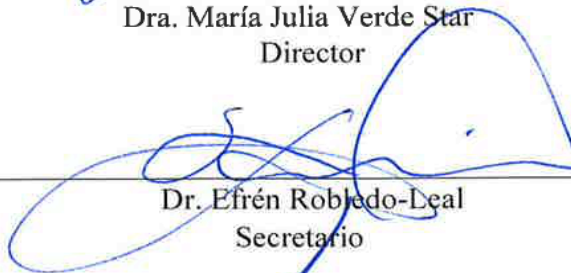
Junio 2021

**ACTIVIDAD ANTIFUNGICA *in vitro* DE
EXTRACTOS CRUDOS Y FORMULADOS DE
Euphorbia tirucalli.**

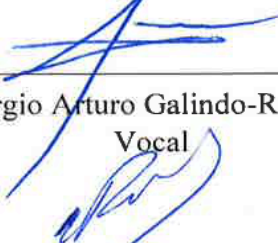
Comité de Tesis



Dra. María Julia Verde Star
Director



Dr. Efrén Robledo-Leal
Secretario



Dr. Sergio Arturo Galindo-Rodríguez
Vocal



Dra. Catalina Rivas-Morales
Vocal



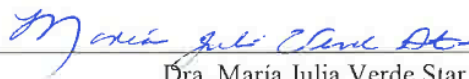
Dr. David Gilberto García-Hernández
Vocal



Subdirector de Posgrado
Dra. Katiushka Arévalo Niño

ACTIVIDAD ANTIFUNGICA *in vitro* DE
EXTRACTOS CRUDOS Y FORMULADOS DE
***Euphorbia tirucalli*.**

Dirección de Tesis



Dra. María Julia Verde Star
Director

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Finaciamiento

Financiamiento Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL CN 357-15

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS ACÁDEMICOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para estudios de posgrado (No. 623209).

DEDICATORIAS

Quiero expresar un sincero y profundo agradecimiento a la Dra. María Julia Verde Star, mi directora de tesis, quien me aceptó como estudiante (desde mi país) para realizar la presente tesis doctoral bajo su dirección. Le agradezco por la confianza que depositó en mí, me ha inculcado un gran sentido de seriedad, responsabilidad, valores, y sabiduría. Siempre me ha facilitado los medios para llevar a cabo todas las actividades académicas y administrativas propuestas durante mi estancia doctoral.

De forma particular, quiero expresar mi inmensa admiración al Dr. Sergio Arturo Galindo, co-director de esta tesis, por sus valiosos consejos, su confianza, su apoyo moral. Su capacidad en siempre encontrar los caminos para guiar mis ideas, sin importar el idioma, siempre ha llegado a satisfacer mi sed de conocimiento y aclarar mis dudas. Es importante mencionar que su disponibilidad, paciencia, comprensión, persistencia, generosidad y el hecho de siempre compartir su experiencia ha sido un punto clave para mi formación y adquisición de experiencia como investigador.

A todos los profesores miembros del comité/no de esta tesis, que aceptaron amablemente ser parte de mi comité de tesis, por su amabilidad y apoyo que me brindaron cada vez que se ocupaba, por la confianza y espacio de trabajo que me proporcionaron con libertad. Quiero nombra particularmente y al Dr. David Gilberto García-Hernández, la Dra. Catalina Rivas y el Dr. Efrén Robledo Leal y el Dr. Eduardo Sánchez por su consideración, apoyo académico y sus conocimientos compartidos.

A todos los Profesores del Instituto de Biotecnología, poniendo un acento particular en el Dr. Galán Wong, el Dr. Benito Pereyra, la Dra. Socoro, Dr. Hamlet y el Dr. Hugo Luna por su cariño, sus conocimientos y experiencias compartidos, constituyeron una gran fuente de motivación, para seguirle adelante y alcanzar mis objetivos académico.

A mis compañeros, en especial a mis amigos Paola García Coronado, Raul Azael y Anthonny, mis compañeros del laboratorio de Química de Productos Naturales (Nancy Espinosa, Karina Briceño, Oscar y), por su amistad y consideración, por los momentos de risa, de conocimiento compartido, complicidad y disponibilidad. Quiero también agradecer a mis amigas Bernadette Ndi et Bárbara Orozco Aimé Orozco por su amistad, su apoyo y por todos los buenos momentos pasados.

A Tania Cristal Navarro Trujillo, por su apoyo moral, consejos, presencia incondicional en los momentos de lucha, por su cariño, ha sido una gran fuente de motivación para seguir luchando por lo mis sueños y alcanzar mis objetivos académicos y personales.

A mi familia, en especial a mi Abuela Yango Augustine, Wangi Marcel, Futgwo Solange Biatrice (c'est la fin qui justifie les moyens), Tebang Heya Yvette (le moment n'est pas a s'asseoir et pleurer, sinon a se lever et se battre), Tchoheu Marguerite Marie, Engome Mboule Elaine Calvine, Nkom Mboulet etienne Anatol, seugnan Alan, Yango Mboumi Grace Noel y Koukong Heya Rosalie (choupinette) por su apoyo moral, emocional, por su presencia en los momentos difíciles, por haber confiado en mí y enseñarme el camino correcto. y a mi tia-hermana Koukong Heya Rosalie que aunque el tiempo dejo su silla vacía, sus consejos siguen vivos en mí.

Agradezco particularmente mi tío Nganyo Heya Maginot gracias gracias a quien mi estancia Doctoral ha sido posible, por el amor que y confianza que siempre ha puesto en sus palabras para guiarme con firmeza y valor. Por compartir su experiencia como investigador conmigo, por su amistad y complicidad, por la confianza y por creer en mí desde mi niñez. Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Lidia Salas, quien dio energía y fuerza que se inicie esta estancia doctoral.

ÍNDICE

Contenido	Pagina
Índice de tablas	I
Índice de figuras	II
Abreviaturas	IV
Resumen	1
Introducción	4
Justificación	6
Hipótesis	7
Objetivo General	8
Objetivos Específicos	8
Capítulo I: Estudio epidemiológico sobre las dermatofitosis en el área metropolitana de Monterrey	9
I.1 Resumen	9
I.2 Introducción	10
I.3 Materiales y métodos	11
I.4 Resultados	19
I.5 Discusión	24
I.6 Conclusión	26
Capítulo II: Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos de <i>E. tirucalli</i>	28
II.1 Resumen	28
II.2 Introducción	28
II.3 Materiales y métodos	30
II.4 Resultados	34
II.5 Discusión	36
II.6 Conclusión	38

Capítulo III: Actividad citoprotectora y fotoprotectora de extractos de <i>E. tirucalli</i>.	42
III.1 Resumen	42
III.2 Introducción	42
III.3 Materiales y métodos	44
III.4 Resultados y discusión	49
III.5 Conclusión	54
Capítulo IV: Actividad antifúngica de extracto de <i>E. tirucalli</i> formulados en nanopartículas poliméricas.	57
IV.1 Resumen	57
IV.2 Introducción	58
IV.3 Material y métodos	59
IV.4 Resultados y discusión	63
IV.6 Conclusión	71

INDICE DE TABLAS

Tabla No	Contenido	Pagina
I.1	Relaciones de agentes clínicos, epidemiológicos y etiológicos de pacientes con dermatofitosis	20
I.2	Otros agentes fúngicos aislados y tropismos correspondientes	22
I.3	Frecuencia de dermatofitosis, dermatofitos y tropismo de lesión con respecto al grupo de edad	23
II.1	Perfil fitoquímico	33
II.2	Actividad Antifúngica de la partición etanólica y metanólica frente a aislados clínicos de dermatofitos.	35
II.3	Perfil fitoquímico de las particiones obtenidas de <i>Euphobia tirucalli</i> .	36
III.1	Constantes $EE(\lambda) * I(\lambda)$ definidas por Sayre et al., 1978 para el caculo de la FPS.	48
IV.1	Características físicas de las nanopartículas poliméricas cargadas con extracto de <i>E. tirucalli</i> .	63
IV.2	Valorización numérica de espectro infrarrojos para cuantificación de extracto formulado en NP.	67
IV.3	Resultados obtenidos para la determinación del porcentaje de encapsulación de extracto en NP-Ext.	69
IV.4	Comparación entre la actividad antifúngica del extracto crudo y formulado en NP polimerica sobre aislados clínicos de dermatofitos.	70

INDICE DE FIGURAS

Figuras	Contenido	pagina
No		
I.1	Zona de muestreo (zona metropolitana de Monterrey)	12
I.2	Casos clínicos de onicomicosis subungueal con distrofia total (a, c), subungueal total con onicogriphosis (b), y subungueal total crónico (f).	13
I.3	Casos clínicos de: (a, b, c, e) dermatomicosis interdigital, (f) dermatomicosis en la planta del pie.	13
I.4	Diagnostico microscópico directo usando el KOH al 15% (40X)	14
I.5	Vista macroscópica, (a) <i>T. schoenleinii</i> , (b) <i>T. tonsurans</i> , (c) <i>T. rubrum</i> var. Granulosa, (d,e) <i>T. rubrum</i> var. Velloso, (f) <i>T. mentagrophytes</i> .	18
I.6	Observación microscópica, (a) <i>T. rubrum</i> , (b) <i>T. mentagrophytes</i> , (c) <i>T. tonsurans</i> , (d) <i>E. floccosum</i> , (e) <i>T. schoenleinii</i> , (f) levadura.	18
I.7	Observación microscópica, (a) <i>Ulocladium sp</i> , (b) <i>Aspergillus sp</i> , (c) <i>Bipolaris sp</i> , (f) no identificados, (e) <i>Fusarium sp</i> , (d) <i>Alternaria sp</i> .	19
I.8	Distribución por grupos de edad en el examen directo, en pacientes con onicomicosis y dermatomicosis.	21
I.9	Relación de la micosis con los diferentes factores clínicos registrados tras el examen microscópico directo	23
II.1	Resultado de la sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>T. rubrum</i> frente a la partición metanólica de <i>E. tirucalli</i> . Control.Cr: control de crecimiento.	34
II.2	Resultado de la sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>T. rubrum</i> frente al clotrimazol.	35
III.1	Prueba de toxicidad y citoprotección sobre eritrocitos humanos de particiones etanólica y metanólica de <i>Euphorbia tirucalli</i> .	46
III.2	Prueba de toxicidad sobre <i>A. Salina</i> de particiones etanólica y metanólica de <i>Euphorbia tirucalli</i> .	47

III.3	Efecto hemolítico de las particiones obtenidas de <i>E. Tirucalli</i> en función de la concentración.	50
III.4	Efecto citoprotector en eritrocitos humanos de las particiones etanólica y metanólica de <i>E. Tirucalli</i> en función de la concentración.	52
III.5	Factor de protección solar (FSP) frente a las radiaciones UV-B de las particiones metanólica y etanólica, usando como control positivo la benzofenona a diferentes concentraciones con respecto a los extractos.	53
IV.1	Síntesis de nanopartículas poliméricas por método de nanoprecipitación.	60
IV.2	A) Estructura química de la Eudragit S100; B) Espectros de FT-IR de nanoesferas de NP-Ext, NP de Eudragit S100 (blanco).	64
IV.2	Espectro infrarrojo comparativo del extracto, del tween 80 al 1% y de la eudragit S100.	65
IV.2	Espectro de IR de soluciones con extracto a diferente concentración.	66
IV.3.	Rango de linealidad de la concentración versus área de bajo de la curva.	66

ABREVIATURAS

KOH: Hidróxido de Potasio
CLSI: Clinical Laboratory estándar Institut
PDA: Papa Dextrosa
CMI: concentración Mínima Inhibitoria
CMF: Concentración Mínima Fungicida
%H: Porcentaje de Inhibición
H₂O: Agua
CYTED: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
SER: Solución Eritrocitaria
PBS: buffer fosfato salino
UV: Ultravioleta
UV-A: Ultravioleta A
UV-B: Ultravioleta B
UV-C: Ultravioleta C
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
PH: Potencial de hidrógeno
Abs: Absorbancia
%h: Porcentaje de hemolisis
%C: Porcentaje de citoprotección
FPS: Factor de protección Solar
NP: Nanopartículas
NP-Ext: Nanopartículas cargadas con extracto
IPD: Índice de Polidispersibilidad
FT-IR: Infrarrojos por transformada de Fourier
%EE: Eficiencia de encapsulación
%E: Porcentaje de Encapsulación
RSD: Desviación estándar Relativa
LoD: Límite de detección
LoQ: Límite de Cuantificación
CO: Concentración Observada
CT: Concentración Teórica

RESUMEN

Desde la antigüedad las plantas han sido utilizadas en la medicina tradicional por sus diversas propiedades terapéuticas (antiparasitarios, antimaláricos, antitumorales, antiviral y antibacterianos, entre otros); la producción de medicamentos a partir de ellas y su uso para la prevención, atenuación o curación de enfermedades dieron lugar a la fitoterapia y ha ido sentando las bases de la farmacopea actual. Sin embargo, todavía hay numerosas plantas a las cuales aún no se les ha examinado totalmente su potencial como plantas medicinales. De acuerdo con esta información, el objetivo del presente proyecto consistió principalmente en determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos y formulados de *Euphorbia tirucalli* sobre aislados clínicos de dermatofitos, sino también de evaluar la toxicidad, citoprotección y fotoprotección de las particiones con mayor actividad biológica. En efecto, las cepas clínicas de dermatofitos se obtuvieron desde noviembre de 2017 a julio de 2018, mediante un estudio epidemiológico realizado en la zona metropolitana de Nuevo León. Las muestras se aislaron de pacientes con signos y síntomas compatibles con la infección por dermatofitos en las uñas y los pies. De los 168 pacientes, 140 (83.33%) fueron diagnosticados con micosis y el 22.02% de las infecciones se debieron a los dermatofitos. Los dermatofitos aislados fueron *Trichophyton rubrum* (45%), *T. interdigitale* (23%), *Epidermophyton floccosum* (9%), *T. tonsurans* (7%), *T. schoenleinii* (5%) y *Trichophyton spp.* (11%); La forma clínica más frecuente fue la *Tinea pedis* (59,46%) asociada a la ocupación laboral de los pacientes. La *Tinea unguium* mostró una correlación con el SIDA, diabetes, hipertensión, hipotensión y edad, respectivamente. La actividad antifúngica, se evaluó sobre *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, con las particiones de *E. tirucalli*; demostraron actividad antidermatofítica frente a *T. rubrum* y *T. interdigitalis* con una CMI de 125 y 500 µg/mL respectivamente con la partición etanólica y de 125 µg/mL para las dos cepas con la partición metanólica. Como control positivo se utilizó el clotrimazol que presentó una CMI de 0.1 µg/mL frente a *T. rubrum* y 0.0004 µg/mL frente a *T. interdigitalis*. Se formularon en nanopartículas poliméricas (cinco lotes), únicamente con la partición metanólica, la cual presentó mayor actividad biológica frente a las cepas de interés; se obtuvieron NP-Ext del tamaño varió entre 90.257 ± 0.935 y 93.737 ± 1.285 , el IPD entre

0.125±0.001 y 0.187±0.006, el potencial Z, entre 5.45±0.435 y -7.797±1.150 ($p>0.05$). Con respecto la cuantificación del extracto formulado, los lotes presentaron un porcentaje de encapsulación bajo de 2.86 a 3.13%; sin embargo, se obtuvo una mejoría en la CMI y en la CMF de las NP-Ext frente a las dos cepas dermatofíticas empleadas, las cuales correspondieron a 55.55 y 250 µg/mL para *T. rubrum*, de 0.1 y 71.43 Para *T. interdigitalis*, respectivamente. Por otro lado, el perfil fitoquímico de las particiones reveló la presencia de esteroides, terpenos, taninos, flavonoides y sesquiterpenos, carbohidratos y grupos carboxilos. Mediante el modelo de *Artemia salina*, se obtuvo que las particiones metanólicas y etanólicas eran moderadamente tóxicas, con una DL₅₀ de 144.77 y 189.54 ppm, respectivamente. La prueba de citoprotección reveló que son potencialmente citoprotectoras dosis-dependiente, alcanzando el 99% de citoprotección a 1000 ppm, lo cual se presume está relacionada con su contenido en polifenoles, respectivamente de 3.52 y 19.46 µg EAG/mg. La prueba de fotoprotección exhibió que estos últimos son fotoprotectores frente a las radiaciones UV-B, alcanzando un FPS > 9 y >18; lo que permite su aplicación como fotoprotectores biológicos. Dichos resultados se fundamentan con la presencia de metabolitos secundarios relacionados con cada actividad biológica.

ABSTRACT

Plants have been used in traditional medicine since ancient times for their various therapeutic properties (antiparasitic, antimalarial, antitumor, antiviral and antibacterial, among others); the production of medicines from them and their use for the prevention, attenuation or cure of diseases gave rise to phytotherapy and has been laying the foundations of the current pharmacopoeia. However, there are still numerous plants that have not yet been fully examined for their potential as medicinal plants. According to this information, the objective of this project consisted mainly of determining the in vitro antifungal activity of crude and formulated extracts of *Euphorbia tirucalli* on clinical isolates of dermatophytes, but also of testing the toxicity, cytoprotection and photoprotection of the partitions with the highest biological activity. Indeed, the clinical strains of dermatophytes were obtained from November 2017 to July 2018, through an epidemiological study carried out in the metropolitan area of Nuevo León. Samples were isolated from patients with signs and symptoms consistent with dermatophyte infection of

the nails and feet. Of the 168 patients, 140 (83.33%) were diagnosed with mycosis and 22.02% of the infections were due to dermatophytes. The isolated dermatophytes were *Trichophyton rubrum* (45%), *T. interdigitale* (23%), *Epidermophyton floccosum* (9%), *T. tonsurans* (7%), *T. schoenleinii* (5%) and *Trichophyton spp.* (11%); The most frequent clinical form was *Tinea pedis* (59.46%) associated with the occupational occupation of the patients. *Tinea unguium* showed a correlation with AIDS, diabetes, hypertension, hypotension, and age, respectively. With regard to antifungal activity, a strain of *T. rubrum* and *T. interdigitale* was selected. Said partitions demonstrated antidermatophytic activity against *T. rubrum* and *T. interdigitalis*, whose MICs were 125 and 500 µg / mL respectively with the ethanolic partition and 125 µg / mL for the two strains with the methanolic partition. Clotrimazole was used as a positive control, which presented a MIC range of 0.1 µg / mL against *T. rubrum* and <0.0004 µg / mL against *T. interdigitalis*. With respect to nanoparticles, only the methanolic partition was formulated, which presented greater biological efficacy against the strains of interest; NP-Ext sizes varied between 90.257 ± 0.935 and 93.737 ± 1.285 , the IPD between 0.125 ± 0.001 and 0.187 ± 0.006 , the Z potential, between 5.45 ± 0.435 and -7.797 ± 1.150 ($p > 0.05$). Regarding the quantification of the formulated extract, the batches presented a low encapsulation percentage of 2.86 to 3.13%; however, an improvement was obtained in the MIC as in the CMF of the NP-Ext against the two dermatophytic strains used. Said MIC and CMF were 55.55 and 250 µg / mL for *T. rubrum*, 0.1 and 71.43 for *T. interdigitalis*, specifically. On the other hand, the phytochemical profile revealed the presence of sterols, terpenes, tannins, flavonoids and sesquiterpenes, carbohydrates and carboxyl groups. Using the *Artemia salina* model, it was obtained that the methanolic and ethanolic partitions were moderately toxic, with an LD50 of 144.77 and 189.54 ppm, respectively. The cytoprotection test revealed that they are potentially dose-dependent cytoprotective, reaching 99% cytoprotection at 1000 ppm, which is presumed to be related to their polyphenol content, respectively 3.52 and 19.46 µg EAG / mg. The photoprotection test showed that the latter are photoprotective against UV-B radiation, reaching an SPF > 9 and > 18; which allows its application as biological photoprotectors. These results are based on the presence of secondary metabolites related to each biological activity.

INTRODUCCIÓN

Desde la era prehistórica, las plantas han sido usadas como fuentes medicinales. Hasta la fecha, una innumerable cantidad de principios activos se han utilizado en la farmacología (Joshi et al. 2018). Con respecto a *E. tirucalli* (árbol de los dedos), es una planta muy usada en medicina tradicional Africana, Brasileña e India, para tratar tumores, excrescencias, entre otros. (Lorenzo-Cáceres 2016; Falasca 2016). Coloquialmente conocida como planta milagrosa, varios trabajos científicos han comprobado el potencial biológico de dicha planta. En efecto, estudios previos apoyan que los extractos cetónicos de *E. tirucalli* tienen un efecto antimicrobiano (Meccia et al. 2008), que el extracto con éter de petróleo presenta una actividad antiparasitaria contra las larvas de mosquitos, actividad anti inflamatoria y analgésica (Mwine et al 2010; Prabha et al. 2008). También se demostró que los extractos con acetona, hexano, metanol, cloroformo y éter de petróleo de los tallos de *E. tirucalli* poseen actividad antimicrobiana (Andrea et al. 2016). Donde la necesidad de seguir buscando nuevos atributos biológicos a dicha planta.

Las dermatofitosis o tiña, son hongos capaces de afectar diferentes partes del cuerpo, causando así una variedad de formas clínicas; dichas infecciones fúngicas son las más comunes en el mundo. Según la OMS, las tiñas representan del 5 al 10% de todas las micosis superficiales (Arenas 2002; Pires et al. 2014). Particularmente en México, las infecciones dermatofíticas constituyen del 70 al 80% de todas las micosis con una frecuencia del 5% en las consultas dermatológicas (Secretaría de Salud 2008). Es importante mencionar que en los últimos años, se ha registrado un incremento en la frecuencia de las dermatofitosis, en el número de casos de ésta enfermedad con fallas terapéuticas (siendo los azoles y alilaminas los principales antifúngicos). También se ha reportado un aumento de casos de zoonosis y de casos crónicos en pacientes con enfermedades crónico degenerativas (Rudramurthy et al. 2018). De acuerdo con Ghannoumy et al. 2016, dichos incrementos están directamente relacionados a la baja biodisponibilidad de los antifúngicos y la alta toxicidad (*in vivo*) de las moléculas biológicamente activas frente a dichos hongos (Ghannoum 2016; Martinez-Rossi et al.

2008). Por lo tanto, es importante proponer soluciones alternativas para remediar este tipo de problema.

Debido a que el uso popular de plantas medicinales evidencia su potencial curativo, es necesario seguir realizando investigaciones científicas adecuadas que utilicen modelos experimentales válidos para demostrar el uso terapéutico de las plantas, o incluso para contribuir a la formulación de nuevos medicamentos (Heinrich y Gibbons, 2001). Con relación a eso, el presente trabajo consistió en evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de diferentes extractos obtenidos de *E. tirucalli*, así como sus formulados respectivos sobre aislados clínicos de dermatofitos, aunado a evidenciar la toxicidad y actividad citoprotectora de dichos extractos.

JUSTIFICACIÓN

El uso de las plantas con fines terapéuticos se remonta desde hace más de 10 mil años (Yesilada, 2005) con evidencia en la lucha contra padecimientos humanos. En efecto, las plantas contienen metabolitos secundarios que son importantes en la protección natural del cuerpo humano y tratamientos de enfermedades; dando la necesidad de investigar las propiedades curativas de algunas plantas, con el fin de encontrar sustancias biológicamente activas, para el tratamiento de enfermedades que afectan al hombre (infecciones microbianas, fúngicas, entre otros) (Joshi et al. 2018; Rafiee et al. 2019).

En las últimas tres décadas, ha renacido el interés por los productos naturales y sus posibles aplicaciones en la industria farmacéutica en la búsqueda de nuevos medicamentos más eficientes. Es importante señalar que cerca de 30% de los fármacos empleados en los países industrializados se han sintetizado a partir de productos vegetales, por lo que podemos considerar las plantas como fuente importante para la producción de medicamentos (Butler 2015)..

Por otro lado, el número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado en el mundo, lo cual se atribuyó a una deficiencia en la función inmunológica, baja biodisponibilidad de los antimicóticos y la alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos (Martinez-Rossi et al. 2008). El tratamiento actual de la dermatofitosis se realiza entre 2 a 6 meses en función de la gravedad de la infección; tiempo relativamente largo durante el cual se puede presentar algunas fallas en su efectividad sobre algunos pacientes; por lo cual es necesario seguir buscando soluciones alternativas en la cura de este tipo de enfermedades, seleccionando con cuidado el principio activo (extracto, fracción o molécula con actividad biológica); es decir aquellos que tienen un efecto nocivo mínimo reducido sobre el hospedero y actividad considerable sobre el agente causal de la infección.

HIPÓTESIS

Los diferentes extractos obtenidos de *E. tirucalli* poseen actividad antifúngica frente a aislados clínicos de dermatofitos (*Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*) y los extractos formulados en nanopartículas tienen mayor efecto que los extractos crudos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica de extractos crudos y formulados en nanopartículas poliméricas de *E. tirucalli* sobre aislados clínicos de dermatofitos (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Aislar e identificar dermatofitos a partir de muestras de pacientes con signos y síntomas compatibles con dermatofitosis en la zona metropolitana de Nuevo León, y establecer la epidemiología de los dermatofitos en la población estudiada.
- ✓ Colectar y obtener extractos (particiones) de *E. tirucalli* (hexano, cloroformo, etanol y metanol).
- ✓ Evaluar la actividad antifúngica de extractos de *E. tirucalli* sobre aislados clínicos de dermatofitos y determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos más activos.
- ✓ Determinar el perfil fotoquímico, evaluar la actividad toxica (citotoxicidad y toxicidad sobre *Artemia salina*), citoprotectora y fotoprotectora de extractos de *E.tirucalli* con actividad antifúngica.
- ✓ Formular en nanopartículas poliméricas los extractos más activos de *E. tirucalli* y evaluar su actividad antifúngica.

CAPÍTULO I: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE LAS DERMATOFITOSIS EN EL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY

I.1 Resumen

Las infecciones cutáneas causadas por dermatofitos (también conocidos como *Tinea*) son las micosis superficiales más frecuentes en México, ya que representan del 70 al 80% de todas las micosis reportadas. En los últimos años, la tasa de *Tinea pedis* ha aumentado en México al igual que *Tinea unguium* (51% y 27% respectivamente), siendo *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* los agentes etiológicos más frecuentes. En el presente estudio, se determinó la prevalencia de infecciones por dermatofitos en la población de la zona metropolitana de Nuevo León, México, correlacionando esta infección con factores de riesgo como edad, sexo, diabetes, SIDA, hiper e hipotensión. Este estudio se realizó desde noviembre de 2017 hasta julio de 2018, a través de un diseño epidemiológico analítico y transversal. Las muestras se aislaron en escuelas, centros médicos, hogares de ancianos y centros podológicos, de individuos (de 13 a 98 años) que presentan signos y síntomas compatibles con la infección por dermatofitos en las uñas y los pies. De los 168 pacientes, 140 (83.33%) fueron diagnosticados con micosis y el 22.02% de las infecciones se debieron a los dermatofitos. Los dermatofitos aislados fueron *T. rubrum* (45%), *T. interdigitale* (23%), *Epidermophyton floccosum* (9%), *T. tonsurans* (7%), *T. schoenleinii* (5%) y *Trichophyton spp.* (11%); La forma clínica más frecuente fue la *Tinea pedis* (59,46%) asociada a la ocupación laboral de los pacientes. La *Tinea unguium* mostró una correlación con el SIDA, diabetes, hipertensión, hipotensión y edad, respectivamente.

I.2 Introducción

Las dermatofitosis son micosis superficiales que afectan la piel y sus anexos, uñas y pelos (Sánchez-Saldaña y Matos-Sánchez 2009). Estas patologías son comúnmente conocido como "*Tinea*" o tiña y son causadas por un grupo de hongos llamados dermatofitos, que pertenecen al filo de la Ascomycota. Una vez que se produce la infección, estos hongos permanecen en las capas queratinizadas y ocasionan la producción de síntomas y signos típicos (comezón, descamación, inflamación, eritema, etc.). Estas infecciones pueden estar influenciadas por una amplia gama de factores, incluyendo la ocupación laboral, la ubicación geográfica, la inmunosupresión, la diabetes, la edad, el sexo, etc. (Isabel et al. 1841; Sánchez-Saldaña y Matos-Sánchez, 2009).

Siendo un problema cosmopolita que predomina en áreas tropicales con climas cálidos y húmedos en todo el mundo (Secretaría de Salud 2008), las tiñas representan del 5 al 10% de la micosis superficial según OMS (Arenas 2002). La prevalencia global estimada de las onicomycosis oscila entre el 2 y el 13%, pero puede alcanzar del 30 al 60% para las personas mayores de 70 años. Las onicomycosis representan del 30 al 40% de las infecciones micóticas superficiales (Pérez et al. 2011). En la Ciudad de México, se informó que la tasa de onicomycosis alcanzó el 27.1% en 2014. (A. Bonifaz et al., 2008). En los países desarrollados, la *Tinea pedis* representa un problema potencial con predominio en entornos urbanos; se considera como una de las dermatofitosis más frecuentes del mundo (Puig y Rull 2011). En particular, la frecuencia de *Tinea pedis* fue del 51% en la Ciudad de México en 2014 (Secretaría de Salud, 2008).

El análisis epidemiológico de una enfermedad permite conocer sus posibles reservorios, rutas de transmisión y factores de riesgo. Este tipo de información es útil para diseñar estrategias y diagnósticos preventivos más efectivos, contribuyendo así al control de la enfermedad (Pratt 1964). Sin embargo, las infecciones por dermatofitos no han generado suficiente interés epidemiológico como otras micosis, quizás porque su diagnóstico y tratamiento no son demasiado complejos; incluso han sido descuidados debido a su capacidad reducida para producir infecciones invasivas, aunque hay algunos informes de dermatofitosis grave en pacientes inmunodeprimidos (Isabel et al. 1841).

En este trabajo se realizó un estudio epidemiológico sobre la dermatofitosis en la zona metropolitana de Monterrey (Nuevo León, México) para establecer su prevalencia general, los agentes causal en pacientes con presunción clínica de la enfermedad y los factores de riesgo relacionados a dicha enfermedad.

I.3 Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en un período de 8 meses (desde noviembre de 2017 hasta julio de 2018); se basó en un diseño epidemiológico analítico y transversal, que incluyó a 168 pacientes con signos y síntomas compatibles con infección por dermatofitos en uñas y / o pies. Los pacientes fueron seleccionados por muestreo secuencial con variables cualitativas (sexo, edad, diabetes, SIDA, hipertensión y hipotensión).

1. Diagnóstico

El muestreo de pacientes se realizó a través de visitas semanales en diferentes municipios del área metropolitana de Nuevo León, México (Figura I.1). Los pacientes seleccionados fueron sometidos a una evaluación clínica usando un formato estándar (anexo 1) que incluía una combinación de variables epidemiológicas (e.j. ubicación geográfica, características clínicas, etc.).

1.1 Toma de muestra

Se tomaron muestras mediante biopsia de uñas y raspado de piel de pacientes que exhibían signos y síntomas sugestivos de infección por dermatofitos, es decir, picazón, hiperqueratosis, descamación, maceración de la piel, engrosamiento de las uñas y cambios de color ungueal.

La toma de muestra se realizó como siguiente: para las onicomycosis distales y laterales (Figura II.2 y II.3), la muestra se obtuvo por raspado el lecho subungueal con una cucharilla de podología estéril, mientras que en las leuconiquias (manchas blancas superficiales), se raspó el área afectada con un bisturí o porta objeto estéril. Para las

dermatomicosis, la toma de muestra se realizó por biopsia, usando una pinza y/o un bisturí.

Una vez obtenidas, las muestras fueron llevadas al laboratorio de Micología y Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y cada muestra clínica se dividió en dos partes.(Kidd et al. 2016)

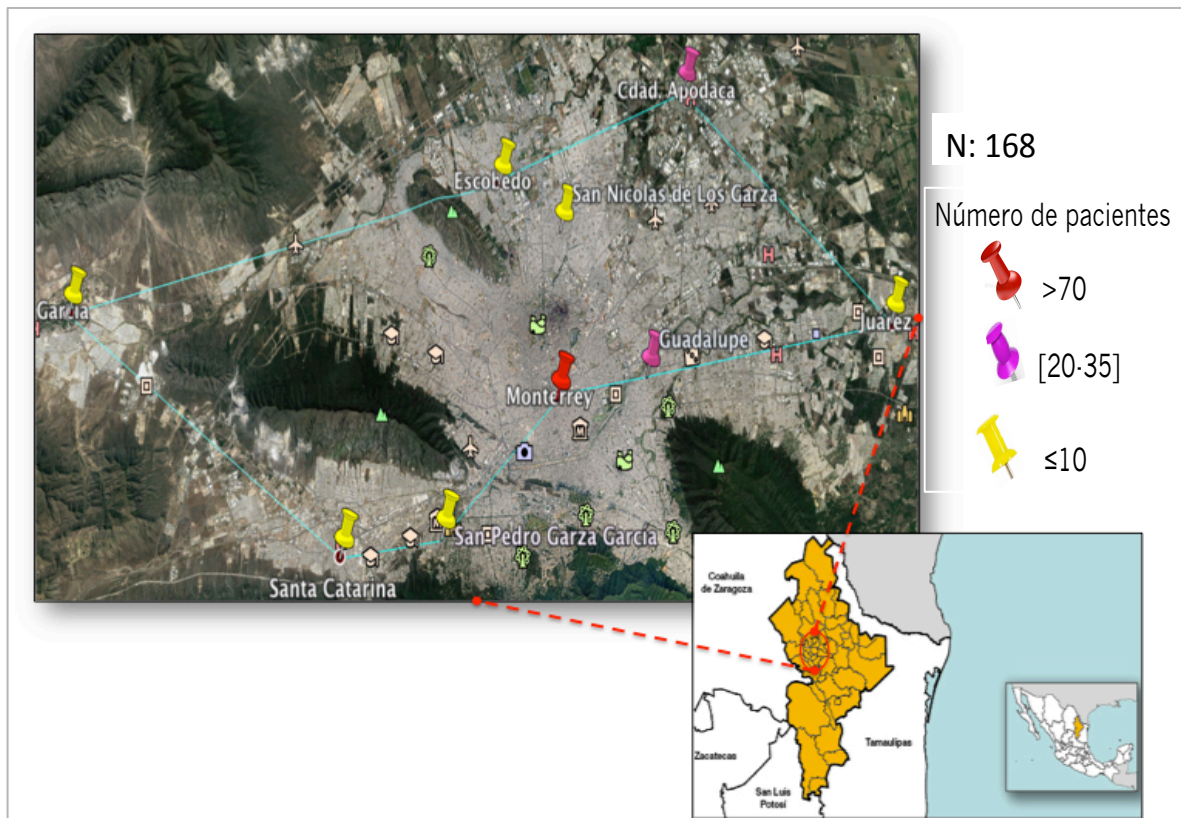


Figura I.1: Zona de muestreo (zona metropolitana de Monterrey).



Figura I.2. Casos clínicos de: (a, c) onicomicosis subungueal con distrofia total, (b) subungueal total con onicogrifosis , (f) subungueal total crónico.

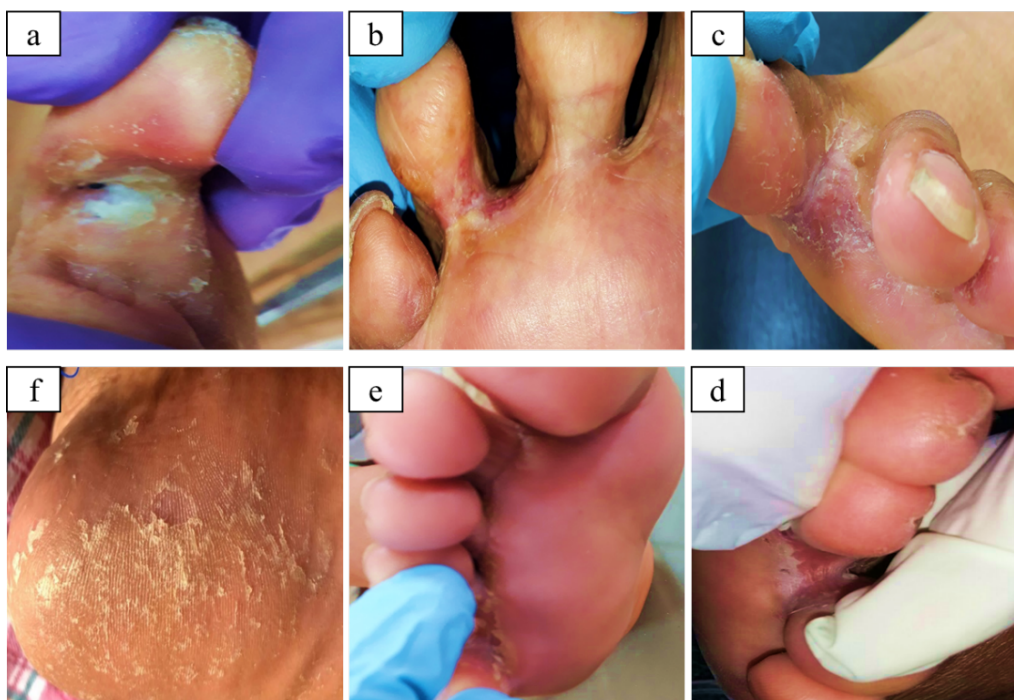


Figura I.3. Casos clínicos de: (a, b, c, e) dermatomicosis interdigital, (f) dermatomicosis en la planta del pie.

1.2 Examen microscópico directo

El diagnostico microscópico directo se realizó con el hidróxido de potasio (KOH) al 15%; dado que KOH es una base fuerte, disuelve los constituyentes celulares y dejando expuestos las estructuras compatibles a hongos (hifas, células, conidias). Por eso, se colocó el material sospechoso entre un porta y cubre objetos con una gota de KOH al 15%, para una posterior observación al microscopio, 5 a 10 min después la exposición del material biológico (Figura I.4).

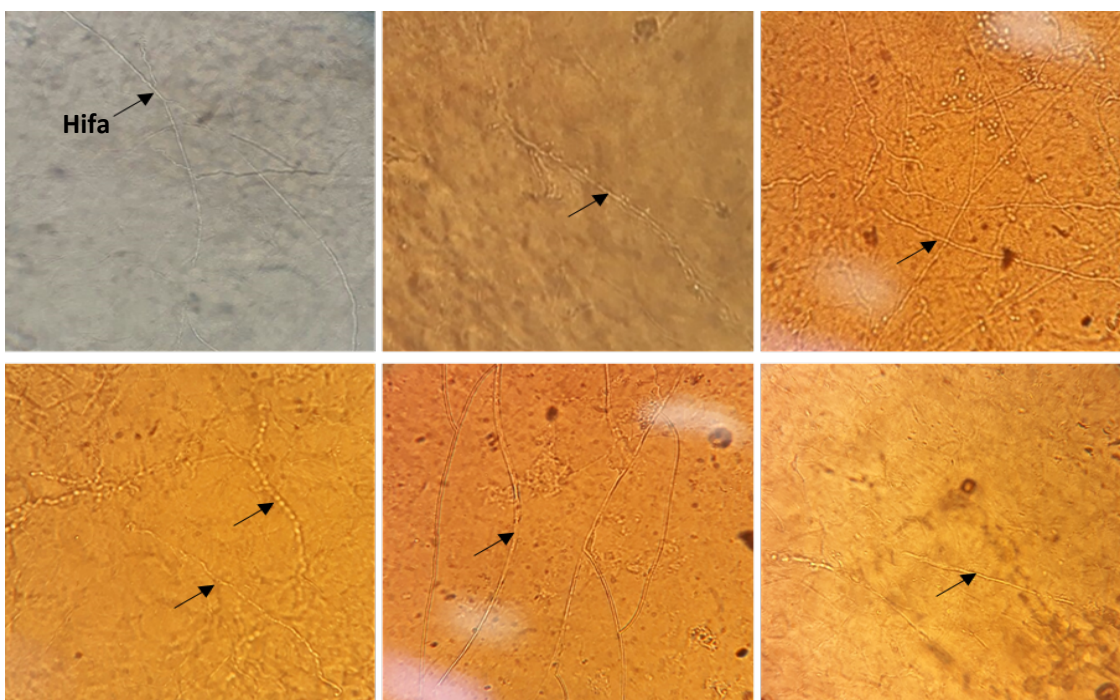


Figura I.4: Diagnostico microscópico directo usando el KOH al 15% (40X)

1.3 Diagnóstico de certeza/ cultivo

Los cultivos se realizaron en el agar mycosel; se colocó un fragmento de uña o piel directamente sobre la superficie del medio estéril, y el inóculo se incubó por un periodo de 7 a 20 d, a 28°C (Figura I.5).

1.4 Identificación de agentes etiológicos

La identificación de los agentes etiológicos se realizó mediante las características macroscópicas de las colonias, incluyendo: color, aspecto y color del pigmento producido; también se consideraron las características microscópicas de las colonias, incluyendo: i) la presencia de macroconidios, su disposición y morfología; ii) presencia de microconidios, su disposición y tamaño) presencia de clamidosporas, tipos de hifas (Figura I.6 y I.7). Dicha identificación fue de acuerdo con Arenas , Bonifaz y el *Manual of Clinical Microbiology* (Jorgensen, n.d.)(Arenas 2002; Bonifaz 2015; Jorgensen 2016). Los resultados del diagnóstico se correlacionaron con las diferentes enfermedades crónico-degenerativas (es decir, diabetes, SIDA, hipotensión e hipertensión), así como con las ocupaciones laborales, particularmente, el grado de sudoración de los pies (alto, medio y bajo).

- ***Trichophyton rubrum***

***T. rubrum* var. vellosa o aterciopelada.** La colonia es de aspecto vellosa, algodonosa, blanca, seca y en algunas ocasiones con micelio color rosa; al reverso presenta un pigmento difuso color rojo vino.

***T. rubrum* var. granulosa.** La colonia es de aspecto pulverulento, blanca o blanco-amarillenta, plana, ilimitada y prácticamente indistinguible de *T. mentagrophytes*; al reverso puede presentar o no pigmento rojo vino.

Micromorfología: *T. rubrum* tiene abundantes hifas delgadas (var. vellosa) tabicadas, de alrededor de 2 μm de diámetro. Presenta muchos microconidios o microaleurioconidios, sobre todo en la variedad granulosa; éstos nacen de las hifas, es decir, de formación artrogénica, con aspecto piriforme o como “gotas”; miden entre 2 y 4 μm de largo y por lo regular se disponen de manera alterna (de cada lado de la hifa) en menor proporción se colocan en forma de “cruz de Lorena”. En colonias viejas los microconidios se ven sueltos. La mayoría de las cepas producen pocos macroconidios o están ausentes; son de

forma alargada, con un extremo redondeado, dando el aspecto de un puro, tienen superficie lisa y miden de 15 a 20 μm de largo por 4 a 6 μm de ancho.

- ***Trichophyton tonsurans***

Macromorfología: la colonia se desarrolla en un tiempo promedio de 10 a 15 d, en medio de PDA de 25 a 28°C; es limitada, aterciopelada, beige o beige-café y puede presentarse de tres formas: acuminada, cerebriforme o crateriforme (para algunos autores Estas características determinan diferentes variedades). Al reverso de la colonia se observa un pigmento café-oscuro difuso, a veces con tonalidades ocre.

Micromorfología: tiene hifas delgadas y tabicadas, un poco más gruesas que las de *T. rubrum*; cuando las cepas son viejas o con muchas resiembras, forman clamidoconidios (clamidosporas) intercalares o terminales. Presenta abundantes microconidios piriformes o en forma de lágrimas, un poco más grandes que las de *T. rubrum*, miden entre 3 y 6 μm de largo, se disponen por lo general en forma de “cruces de Lorena” (con un microconidio al término de la hifa) y el resto en forma paralela; es decir, su disposición es a la inversa de *T. rubrum*. Tiene escasos macroconidios en forma de “puros” de aproximadamente 15 a 20 μm de tamaño, y con tres a cuatro septos o lóculos.

- ***T. mentagrophytes***

Incluye con dos variedades: *mentagrophytes e interdigitale*.

***T. interdigitale vellosa*.** La colonia es algodonosa, seca e ilimitada; por lo regular no forma pigmentos, aunque hay algunas cepas (lacticolor) que dan un pigmento rojo vino.

***T. mentagrophytes granulosa*.** La colonia se presenta de aspecto pulverulento o polvoso, plana, seca, ilimitada, de color blanco o blanco-amarillento; en raras ocasiones también puede formar pigmentos.

Micromorfología: *T. mentagrophytes* presenta abundante micelio delgado y tabicado, sobre todo la variedad vellosa. En la forma granulosa se forman gran cantidad de microconidios libres, redondos o piriformes; estos últimos pueden nacer en particular de las hifas, en forma alterna o en “cruces de Lorena”. Presenta escasos macroconidios en

forma de puro, de paredes lisas con dos a cuatro tabiques o lóculos y miden entre 20 y 40 μm de largo por 6 a 8 μm de ancho.

- ***Trichophyton schoenleinii***

Macromorfología: se desarrolla en un tiempo promedio de 10 a 15 d a temperatura entre 25 y 28°C en medio de PDA y tiene un crecimiento lento. Las colonias son de forma de panal y un crecimiento subsuperficial; de color crema a amarillo a marrón anaranjado, planas y de aspecto vellosa. No produce ninguno pigmento de difusión al reverso

Micromorfología: No se observan macroconidios y microconidios en cultivos de rutina, y pueden existir numerosas clamidosporas. se pueden observar las hifas de la "cabeza de clavo"/ "candelabros favic".

- ***Epidermophyton floccosum***

Macromorfología: *E. floccosum* se desarrolla en un tiempo promedio de 10 a 15 d a temperatura entre 25 y 28°C en medio de PDA. Las colonias son limitadas, aterciopeladas, de color blanco-beige; en ocasiones pueden tomar aspecto crateriforme o cerebriforme; al reverso Presenta un pigmento difusible amarillo-verdoso.

Micromorfología: tiene micelio delgado y tabicado. Sólo presenta macroconidios en forma de clavos o bastos, con una base delgada y un extremo romo; miden aproximadamente 20 a 40 μm de largo por 8 a 10 μm de ancho. Cuando las cepas son viejas, se observan abundantes clamidoconidios intercalares y terminales.

- **Hongos filamentosos no dermatofitos**

Dichos agentes fúngicos se identificaron mediante el mismo protocolo de identificación de los dermatofitos (características macroscópicas y microscópicas).

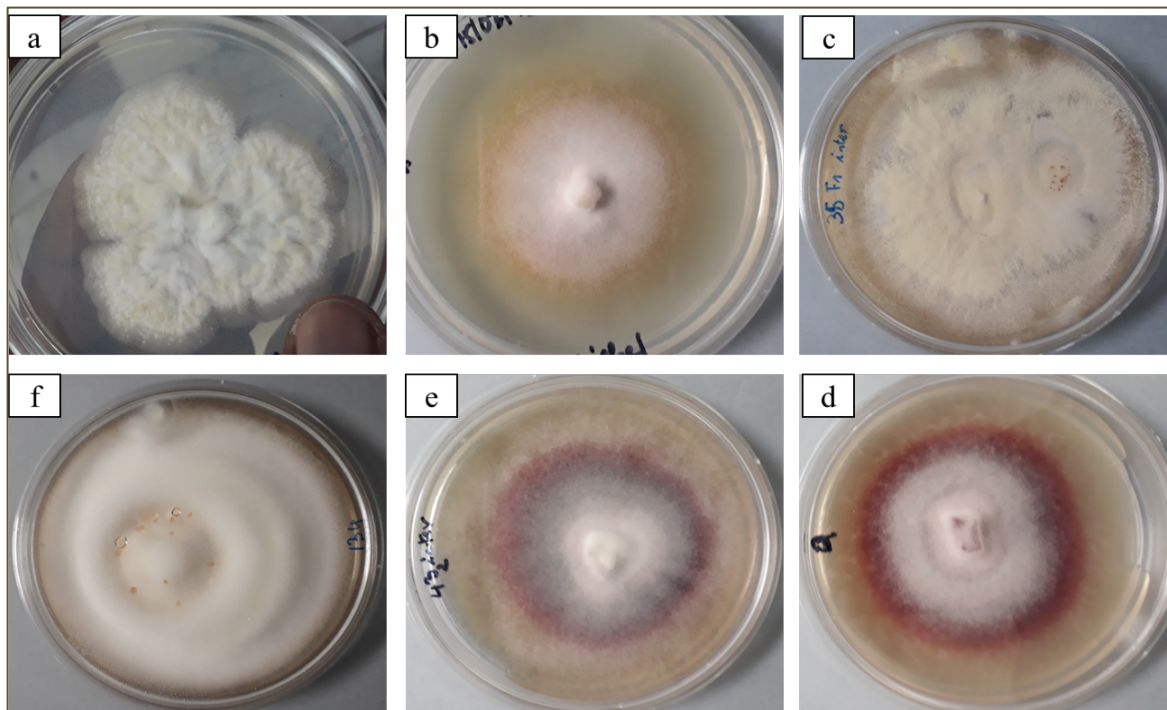


Figura 1.5. Observación macroscópica, (a) *T. schoenleinii*, (b) *T. tonsurans*, (c) *T. rubrum* var. Granulosa, (d,e) *T. rubrum* var. Velloso, (f) *T. mentagrophytes*.

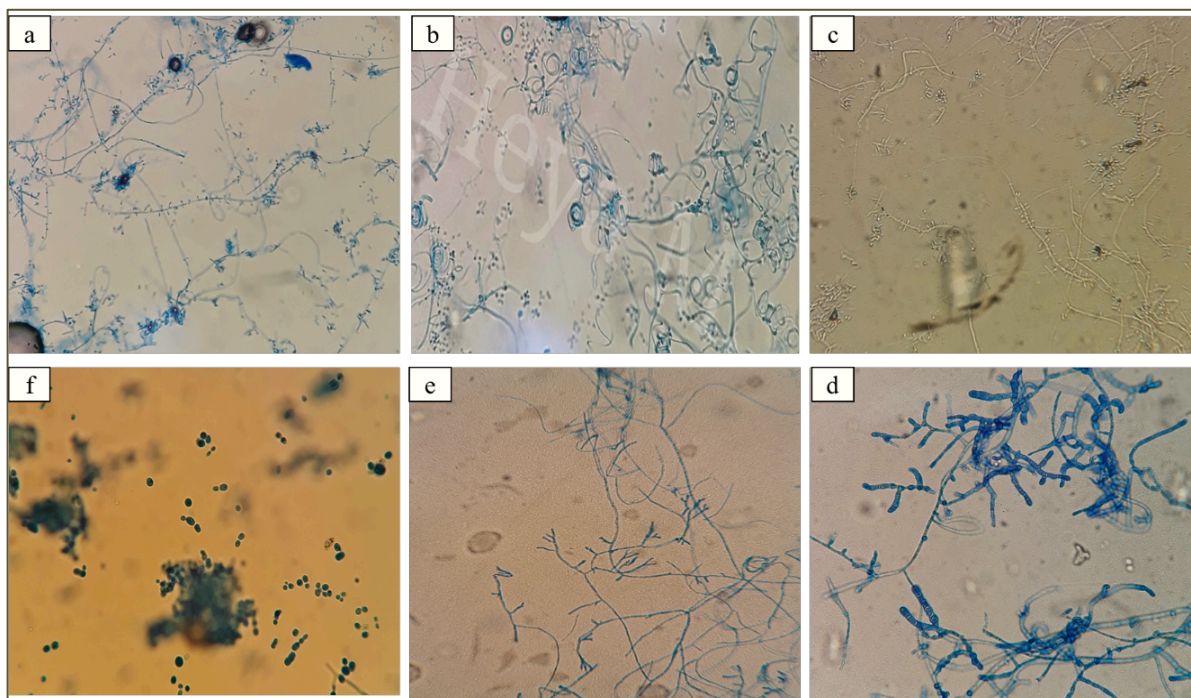


Figura 1.6. Observación microscópica, (a) *T. rubrum*, (b) *T. mentagrophytes*, (c) *T. tonsurans*, (d) *E. floccosum*, (e) *T. schoenleinii*, (f) levadura.

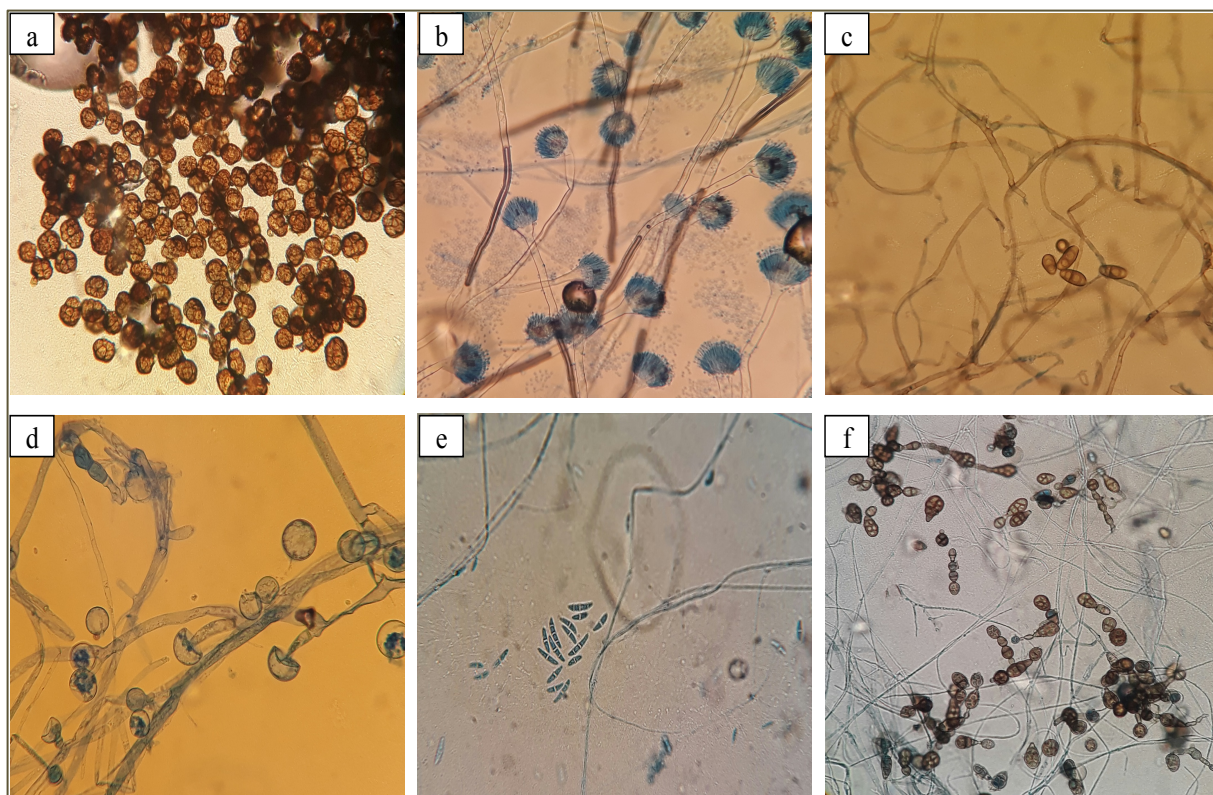


Figura 1.7. Observación microscópica, (a) *Ulocladium sp.*, (b) *Aspergillus sp.*, (c) *Bipolaris sp.*, (f) no identificados, (e) *Fusarium sp.*, (d) *Alternaria sp.*

2. Análisis Estadístico

Con los datos obtenidos del capítulo 1, se realizó una base de datos en Excel 16.0® y el análisis fue realizado por el software SPSS V 20®. El tamaño de la muestra se calculó mediante el software Excel® fisterra. Para el análisis, se utilizaron datos cuantitativos y la prevalencia se expresó como porcentaje, con un nivel de confianza del 95% (error = 0.05); la epidemiología se estableció utilizando la prueba de análisis de componentes principales.

1.4 Resultados

Se incluyeron un total de 168 pacientes en este estudio, con edades comprendidas entre 13 y 98 (media 38.6 ± 24.7), 51.19% hombres y 48.21% mujeres. El examen microscópico directo mostró que el 83.33% de los pacientes tenían una infección por hongos (es decir, células en gemación y pseudohifas para levaduras, o hifas para hongos filamentosos). Aunque la mayoría de los pacientes eran hombres, las mujeres exhibieron

una mayor cantidad de examen microscópico directo positivo (46.43% frente a 53.57% respectivamente). Para las mujeres, las uñas fueron el área del cuerpo donde se registró la mayor frecuencia de infección (58.02%), mientras que para los hombres representaron el 41.98% (relación de 1.4: 1). La dermatofitosis en los pies se diagnosticó en un 54.79% para los hombres en comparación con un 21% para las mujeres (proporción de 1.2: 1; Tabla I.1).

Tabla 1. Relación entre características clínicas, epidemiológicas y agentes etiológicos de pacientes con dermatofitosis

Muestras	Numero total de pacientes		KOH positivo		Cultivo positivo		Agente etiológico (dermatofitos)				
	N: 168	100%	n: 140	83.33%	n: 37	22.02%	n:44				
	X: 188	--	Dermato-micosis	Onicho-micosis	<i>tinea pedis</i>	<i>tinea unguium</i>	A	B	C	D	E
Edad			18-98 años								
Genero:											
Hombre	86		40	34	12	9	9	5	1	2	5
Mujer	82		33	47	10	9	11	5	3	1	2
Hipertensión	19		4	10	1	2	2	1	0	0	0
Hipotensión	13		12	0	1	1	2	0	0	0	0
Diabetes	40		14	22	3	9	8	2	0	0	2
SIDA	3		1	0	1	1	1	1	0	0	0
Sudoración:											
Alta	94		41	50	19	4	9	7	3	3	4
Media	11		3	6	2	2	3	1	0	0	0
Baja	63		29	25	1	12	8	2	1	0	3
Total			73	81	22	18	20	10	4	3	7
%			43.45	48.21	13.1	10.71	45	23	9	7	17

A) *T. rubrum*, B) *T. interdigitale*, C) *E. floccosum*, D) *T. tonsurans*, E) *Trichophyton* spp.
N. Numero total de pacientes; X. Numero total de muestras; n. Numero total de diagnostico positivo.

Aunque la mayoría de los pacientes eran menores de 40 años ($n = 101$), el mayor porcentaje de micosis se encontró en pacientes mayores de 40 años (70.37%); el porcentaje más bajo fue en pacientes de edad entre 31 y 40 años (7.40%, figura I.8). En cuanto a la ocupación laboral, la mayoría de los agentes etiológicos fueron aislados de pacientes con ocupación laboral relacionados con la alta sudoración (55.95%).

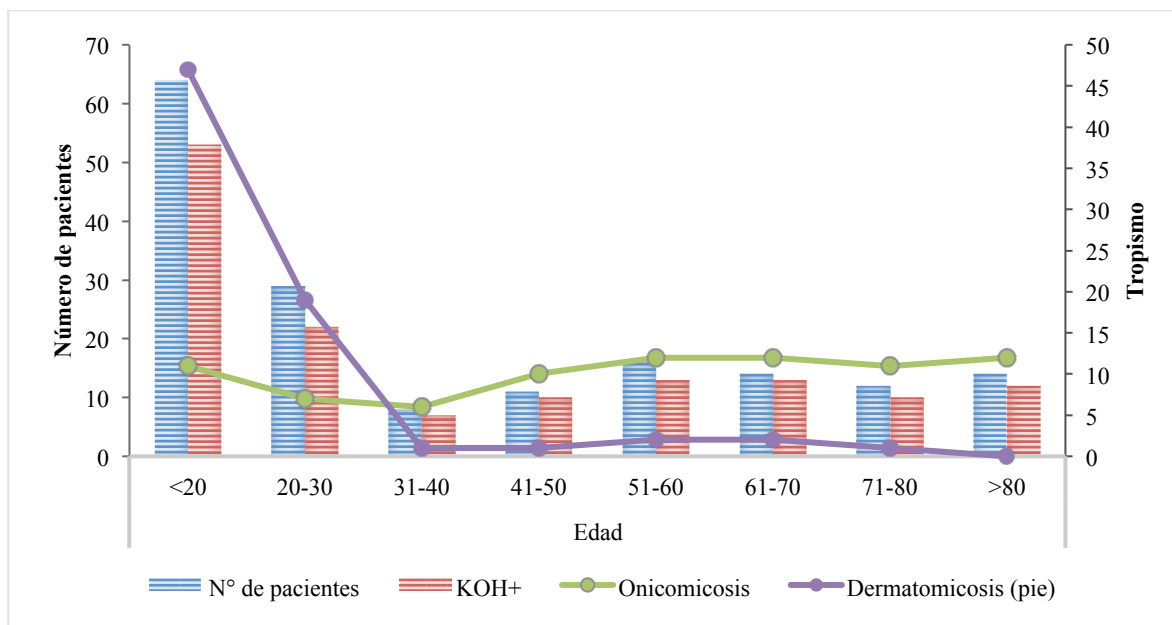


Figura I.8. Distribución por grupos de edad en el examen directo, en pacientes con onicomycosis y dermatomycosis.

Entre los hongos detectados en las muestras mediante un examen microscópico directo (Tabla I.1), se encontraron altas frecuencias de hongos filamentosos no dermatofitos ($n = 74$) y levaduras ($n = 18$) (Tabla I.2). Con respecto a los hongos filamentosos no dermatofitos, los principales géneros fueron *Aspergillus sp*, *Cladosporium sp*, *Penicillium sp* y *Fusarium sp* (Tabla I.2). Por otro lado, se aislaron dermatofitos de las uñas y la piel de los pies, correspondientes a 19 y 25 pacientes, respectivamente. Los agentes etiológicos más frecuentes fueron *T. rubrum* y *T. interdigitale* (Tabla I.1).

Tabla I.2. Otros agentes fúngicos aislados y sus tropismos correspondientes

Grupos	Especies	N	piel	uñas
Levaduras y hongos levaduriformes (n=15)	levaduras	12	5	7
	<i>Trichosporon</i> spp .	3	1	2
	<i>Aspergillus</i> spp .	14	3	11
Hongos filamentosos no dermatofitos (n=63) *Nota: Se obtuvo 13 mohos asociados con dermatofitos	<i>Cladosporium</i> spp .	14	11	3
	<i>Penicillium</i> spp .	12	6	6
	<i>Fusarium</i> spp .	7	5	2
	<i>Paecilomyces</i> spp .	4	2	2
	<i>Bipolaris</i> spp .	3	1	2
	<i>Acremonium</i> spp.	3	1	2
	<i>Alternaria</i> spp .	2	2	0
	<i>Curvularia</i> spp .	1	0	1
	<i>Ulocladium</i> spp .	1	1	0
Desconocidos (n=14)	--	14	--	--
Total		92		

Para realizar el análisis comparativo, solo se consideraron los casos positivos de infección por dermatofitos y los datos epidemiológicos del anexo 1. Como se muestra en la Tabla I.3, la frecuencia de dermatofitosis en los pies fue mayor en pacientes menores de 30 años (22/37), mientras que la onicomycosis (*Tinea unguium*) fue más frecuente en pacientes mayores de 40 años (13/18). Aunque la frecuencia más alta en pacientes con diagnóstico directo positivo fue en mujeres, el número de dermatofitos aislados en los dos sexo fue igual. En particular, *Tinea pedis* fue más frecuente en personas con una alta sudoración (es decir, estudiantes y atletas, Tabla I.3). *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton* spp se aislaron con mayor frecuencia de las uñas, mientras que *T. interdigitale*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii* y *E. floccosum* se aislaron con mayor frecuencia de la piel.

Tabla I.3: Frecuencia de dermatofitosis, dermatofitos y tropismo de la lesión con respecto a los grupos de edades.

Años	Dermatofitosis	Dermatofitos	<i>Tinea pedis</i>	<i>Tiña ungueal</i>
<20	14	17	12	3
20-30	8	9	7	1
31 - 40	0	0	0	0
41 - 50	4	5	1	4
51 - 60	5	5	1	4
61 - 70	1	1	0	1
71 - 80	2	2	1	2
> 80	3	4	0	3
Total	37	44	22	18

Por otro lado, la ocupación laboral fue el factor de riesgo más relacionado con la dermatofitosis (componente 2, Figura I.9b). No hubo distancia entre la ocupación laboral y la *Tinea pedis* (componente 2), mientras que la *Tinea unguium* se relacionó con los otros factores clínicos (componente 3). Teniendo en cuenta la disposición de los dos sexos en la gráfica, el sexo no puede considerarse como un factor que influye en la infección por dermatofitos.

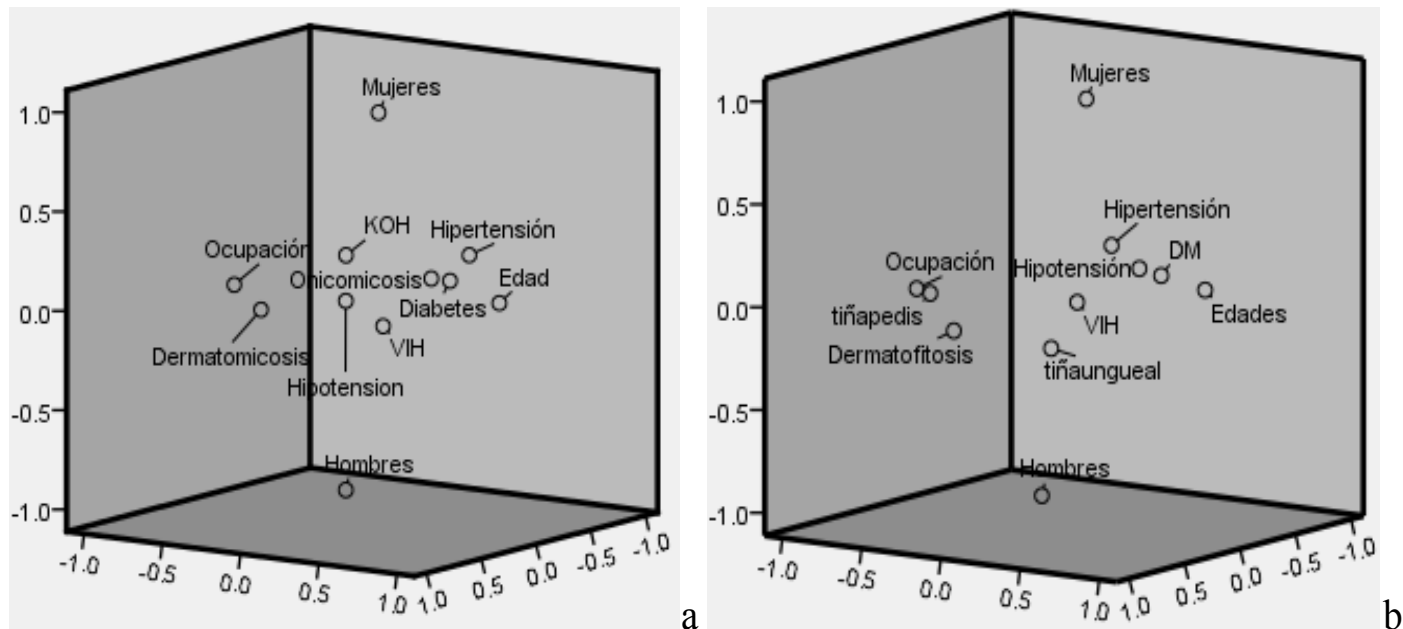


Figura I.9. Relación de la micosis con los diferentes factores clínicos registrados tras el examen microscópico directo. (a) (componente 1: Hombres y Mujeres; componente 2: Ocupación y Dermatofitosis; componente 3: Hipotensión, SIDA, Edades, Diabetes, Hipertensión y Onicomicosis). Relación de la infección por dermatofitosis con los diferentes factores clínicos registrados y tropismo correspondiente (b) (componente 1: Hombres y Mujeres; componente 2: Ocupación, Tinea pedis y Dermatofitosis; componente 3: Tinea Unguium, SIDA, Hipotensión, Diabetes, Edades, Hipertensión).

I.5 Discusión

Las infecciones por hongos son extremadamente frecuentes en países tropicales y subtropicales debido a condiciones cálidas y húmedas, que favorecen el crecimiento y la diseminación de hongos (Restrepo y Cardona 2013). La tiña ungueal es un trastorno muy común, que representa el 30% de la dermatofitosis y el 85-87% de la onicomycosis con una relación hombre: mujer de 1.5: 1.(Arenas 2002) en estudios previos, se ha reportado que la prevalencia de la onicomycosis es de 13.8% en los Estados Unidos, 12.4% en Alemania, 9.1% en Canadá, 2.1% en España y 3.8% en Colombia.(Pérez et al. 2011) En los últimos diez años, ha habido un aumento considerable en la frecuencia de *Tinea pedis* del 26% al 45-52% (Arenas 2002); En México, la dermatofitosis alcanzó un nivel considerable en 2014, con 27.1% para *Tinea unguium* y 51% para *Tinea pedis*(Bonifaz 2015).

En este estudio, se encontró una mayor incidencia de onicomycosis en personas mayores de 40 años con un porcentaje del 70.37% (Figura I.8), predominando en mujeres (53.57%) con una relación mujer: hombre de 1.3: 1 (Tabla I.1). Estos resultados son similares a los encontrados por Pérez et al. 2011 en un estudio epidemiológico similar en Colombia. Estos hallazgos podrían explicarse por un calzado más expuesto en las mujeres y un mayor cuidado general de sus pies, lo que conduce a la eliminación constante de tejido queratinizado en exceso, lo que reduciría las defensas naturales. También podría estar relacionado con los factores de riesgo que pueden favorecer la infección por hongos, ya que se afirmó que la onicomycosis se correlaciona con enfermedades crónicas degenerativas (Figura I.9a), que afectan a las mujeres con mayor frecuencia (Tabla I.1). La falta de estas enfermedades, junto con una mejor higiene y una mayor capacidad regenerativa de la piel y las uñas, puede respaldar la menor incidencia de dermatomycosis en personas de 31 a 40 (7.40%).

En la Figura I.9a, se puede observar una reagrupación entre las variables que incluyen onicomycosis, diabetes, hipertensión, SIDA e hipotensión (componente 3); esta baja distancia entre la onicomycosis y dichas enfermedades puede sugerir que estos últimos pueden influir en las infecciones micóticas en las uñas. En particular, la diabetes tenía la distancia más cercana a la onicomycosis, lo que sugiere que puede considerarse como el

principal factor de predisposición a la infección por hongos en uñas. Se sabe que la diabetes proporciona una condición adecuada para la proliferación de hongos en el cuerpo, ya que causa hiperglucemia, daño a la microcirculación periférica con hipoxemia secundaria, trauma cutáneo asociado (uñas), alteración de la inmunidad celular y alteración de la función de los neutrófilos. De acuerdo con Diego et al. 2018, la hipohidrosis no influye en las infecciones por dermatofitos en los pies (Jiménez-(Olvera y Briseño–Gascón 2017).

La *Tinea pedis* fue más frecuente en pacientes de 20-30 años (18,92%) y menores de 20 años (32,43%), mientras que la *Tinea unguium* fue más frecuente en pacientes mayores de 40 años. Dicho resultado puede ser respaldado por un mayor nivel de sudoración en pacientes menores de 40 años, debido a un mayor metabolismo y un estilo de vida más activo; También se debe considerar que la mayoría de los pacientes menores de 30 años eran deportistas de alto rendimiento.

En la Figura I.9a se puede observar que la onicomicosis se asoció con las enfermedades crónico-degenerativas, así como a la edad. De hecho, se muestra en la Figura 4b, la asociación entre las variables de la componente 3 (es decir, *Tinea unguium*, SIDA, hipertensión, hipotensión, diabetes y edad), debido a la baja distancia entre estos últimos; dicho resultado puede explicarse por el daño a la microcirculación periférica, la función alterada de los neutrófilos y el trauma cutáneo por dermatitis en pacientes que padecen de dichas enfermedades (Arenas y Moreno 2010; Jiménez-Olvera y Briseño–Gascón 2017).

Como se muestra en la Tabla I.1, los dermatofitos aislados con mayor frecuencia en el presente trabajo fueron *T. rubrum* (45%), *T. interdigitale* (23%) y *E. floccosum* (9%). Esta tendencia se ha observado en México y Argentina desde 1940. También encontramos algunos casos en los que se identificaron *T. tonsurans* (7%) y *T. schoenleinii* (5%). Estos resultados son similares a los encontrados en un estudio realizado en la Ciudad de México en 2002. El predominio de *T. rubrum* puede ser hipotetizado principalmente por los factores intrínsecos del hongo, como su resistencia y fácil diseminación en comparación con otros dermatofitos; también, a la introducción de

griseofulvina como agente antifúngico en diferentes tiñas, lo que condujo a la eliminación de agentes comunes como *M. audouinii* y *M. schoenleinii*. (Drakensjö y Chrysanthou 2011; Havlickova et al. 2009; Mariana et al. 2018)

En cuanto a la correlación de los agentes etiológicos con el sexo, los dermatofitos se aislaron a igual frecuencia en los hombres como en mujeres. Sin embargo, se obtuvo mayor frecuencia de *T. rubrum* en mujeres igual que en pacientes inmunodeprimidos (Tabla I.1); Dicho resultado concuerda con el Consenso Mexicano de Micosis Superficial de 2010 (Drakensjö y Chrysanthou 2011).

I.6 Conclusión

Las dermatofitosis son micosis superficiales muy frecuentes, con variaciones en su frecuencia según la edad, la ubicación geográfica, el estado de higiene y el historial médico de los pacientes. De hecho, su diagnóstico favorable constituye una de las principales herramientas para un tratamiento adecuado y efectivo, evitando así fallas terapéuticas y la aparición de cepas fúngicas resistentes.

CAPITULO II: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE *Euphorbia tirucalli* (En revisión en la revista Heliyon)

II.1. Resumen

El presente trabajo consistió en evaluar la sensibilidad *in vitro* de aislados clínicos de dermatofitos frente a las particiones etanólica y metanólica de *E. tirucalli* L. En efecto, el perfil fitoquímico reveló la presencia de esteroides, terpenos, taninos, flavonoides, sesquiterpenos, carbohidratos y grupos carboxilos. Dichas particiones demostraron actividad antidermatofítica frente a *Trichophyton rubrum* y *T. interdigitalis* cuyas CMI's fueron de 125 y 500 µg/mL respectivamente con la partición etanólica y de 125 µg/mL para las dos cepas con la partición metanólica. Como control positivo se utilizó el clotrimazol que presentó un rango de CMI de 0.1 µg/mL frente a *T. rubrum* y < 0.0004 µg/mL frente a *T. interdigitalis*. Es importante mencionar que las particiones hexánica y clorofórmica no presentaron actividad biológica frente a las cepas de interés; estos resultados se fundamentan con la presencia de grupos de compuestos relacionados con dicha actividad.

II.2 Introducción

Las dermatofitosis o tiñas (*Tinea*) son micosis superficiales causadas por un grupo de hongos queratinofílicos estrechamente relacionados, denominados dermatofitos. Estos afectan la capa córnea de la piel, pelos y uñas (Isabel et al. 1841; Mayorga y Prado-trillo 2016). Son las infecciones fúngicas más comunes en todo el mundo, afectando negativamente la calidad de vida de los pacientes en todos los grupos de edad (Pires et al. 2014). Aunque la incidencia de las dermatofitosis depende de los países, es importante mencionar que es similar, de acuerdo a varios trabajos de investigación; en España, 20.8%; en Brasil, 26.3%; en Irán, 24% (Manzano-gayosso et al. 2008). En México, las dermatofitosis constituyen del 70 al 80% de todas las micosis y tienen una frecuencia del 5% en las consultas dermatológicas. Específicamente en el IMSS, en 2006, se registraron

507 849 consultas en medicina familiar, 9 745 en urgencias y 19 404 en especialidad; siendo la onicomycosis la primera causa de las enfermedades ungueales, corresponde del 18 al 40% de todas las onicofagias, con una prevalencia mundial de 0.1 al 11% (Secretaría de Salud 2008).

El tratamiento de las infecciones por dermatofitos se resume generalmente al uso de azoles (ketoconazol, clotrimazol, itraconazol, fluconazol, entre otros) y alilaminas (terbinafina, naftifina, amorolfina). Sin embargo, al igual que se ha reportado reportado la resistencia de cepas dermatofíticas hacia los azoles, debido a la inhibición de la síntesis del ergosterol en su fase tardiva, también, se ha reportado lo mismo frente a las alilaminas (terbinafina) (Ghannoum 2016; Martinez-Rossi et al. 2008). Por otro lado, el aumento de los casos de zoonosis y de casos crónicos de infecciones dermatofíticas en pacientes con enfermedades crónico-degenerativas han convertido dichas infecciones en un blanco importante (Rudramurthy et al. 2018). Además de la evidencia de los efectos secundarios que el uso de estos fármacos produce, nos llevan a proponer nuevos antifúngicos sin efectos secundarios.

Como se mencionó anteriormente, debido a los efectos secundarios de algunos antifúngicos, la resistencia frecuentemente inducida y los elevados costos en el tratamiento (Davicino et al. 2007), se ha orientado la búsqueda en la utilización de extractos crudos de plantas para el control de enfermedades humanas (Dabur et al. 2004; Fenner et al. 2005). Así mismo, existen extractos de plantas comúnmente usadas en la medicina tradicional que tienen actividad antidermatofítica contra *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *M. Canis*, antibacteriana frente a *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* (García 2016; Rojas et al. 2003; Sule et al. 2012).

Euphorbia tirucalli L., es una planta muy usada en la medicina tradicional africana y en muchas otras, para tratar excrescencias, nódulos, abscesos, entre otras. En Brasil, el látex de *E. tirucalli* L. se usa para tratar verrugas, epiteloma, sarcoma, tumores de piel y lepra. En ciertas partes de África Oriental, se usa para la extracción de parásitos de la piel. (Falasca 2016; Lorenzo-Cáceres 2016). En un estudio realizado por Upadhyay et al. 2010 se demostró que los extractos alcohólicos de la corteza del tallo y las hojas de *E. tirucalli* presentan actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida*

tropicalis, *C. albicans* y *A. Niger* (Upadhyay et al. 2010). Por su parte, Gupta et al. 2013 reportaron que los extractos de acetona, hexano, metanol, cloroformo y éter de petróleo del tallo de *E. tirucalli* presentaban actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Bacillus megaterium*, el extracto acuoso de partes aéreas de *E. tirucalli* L. tiene la propiedad de eliminar los aniones superóxido y de eliminar los radicales hidroxilo.

Por tales motivos, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antimicrobiana de particiones obtenidas de *E. tirucalli* L sobre aislados clínicos de dermatofitos (*T. rubrum*, *T. interdigitalis*).

II.3 Materiales y métodos

1- Obtención del material vegetal

La colecta de *E. tirucalli* se llevó a cabo al norte del municipio de San Nicolás de los Garza, en el Estado de Nuevo León, México. Se clasificó taxonómicamente en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y fue registrada en el herbario bajo el número de folio 029755. El material vegetal fue lavado profundamente con agua destilada y secado a una temperatura de 40 °C con una lámpara de luz blanca (150 watts). Posteriormente, el material fue molido usando un triturador manual para su uso en la obtención de las particiones.

2- Preparación de las particiones

El material vegetal seco y molido fue sometido a extracción continua en un equipo Soxhlet con hexano, cloroformo, etanol y metanol. Las particiones fueron recuperadas y los solventes eliminados a presión reducida (Evaporador rotativo Yamato mod. RE200). Las particiones se llevaron a sequedad en una estufa de secado a una temperatura no mayor a 40 °C. Una vez libres de solventes, las cuatro particiones se conservaron a 20°C hasta su uso.

3- Preparación del material vegetal

Para preparar la solución madre del material vegetal, se pesó 20 mg de cada partición en tubos cónicos de 1.5 mL de capacidad a los cuales se agregaron 1 mL del solvente correspondiente y se homogenizó por ultrasonido durante 20 min, para obtener una solución madre de 20 000 µg/mL.

4- Preparación de inóculos

Las cepas fueron activadas inicialmente en agar papa dextrosa (PDA), durante 21 d a 28°C. Posteriormente, las colonias fúngicas fueron cubiertas con 10 mL de agua destilada estéril, y se rasparon suavemente las superficies con un asa estéril; las mezclas obtenidas fueron posteriormente filtradas con una gasa estéril, para separar las conidias de las hifas y partículas de agar. Antes de realizar las pruebas biológicas, las suspensiones de conidias fueron ajustadas a una concentración de 1 a 3 x 10³ UFC/mL después de un conteo en un hematocitómetro.

5- Determinación de la actividad biológica de las particiones obtenidas de *E. Tirucalli*

La sensibilidad antifúngica *in vitro* se determinó mediante una modificación del método de microdilución descrito en el protocolo de M38-A (*Clinical for Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard- second edition. Document M38-A2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008*) por el Clinical and Laboratory Standards Institute, usando como control el clotrimazol (Sigma-Aldrich). En efecto, a partir de las soluciones madres de las particiones (20 000 ppm), se obtuvieron soluciones con concentración de 8000 ppm, para realizar diluciones posteriores. Con respecto a los controles positivos, se obtuvieron diluciones de 10 veces menores a las soluciones stock (1000 µg/mL).

De las soluciones obtenidas, se realizaron diluciones seriadas en microplacas de 96 pozos a fondo plano, usando como diluyente el caldo Müeller-Hinton con rojo fenol como indicador de pH (se obtuvieron concentraciones iniciales de 0.015-4000 µg/mL). Posteriormente, se agregaron 100 µL de solución de conidias para obtener concentraciones finales de 0.0076-2000 µg/mL de los tratamientos, contrastando con 0.0001 a 25 µg/mL para el control positivo. Como blanco el mismo sistema de dilución de las particiones en el diluyente, sin inóculo; se usó como control negativo el metanol, mediante el mismo sistema de dilución con inóculo. Con respecto al control de crecimiento, se inocularon 100 µL de cada cepa en 100 µL de medio. Las mezclas obtenidas se incubaron a 28°C durante 120 h.

La actividad antifúngica se determinó mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida según la CLSI como aquella concentración capaz de inhibir el crecimiento del hongo (%H) en un 80% en comparación con el control de crecimiento.

$$\%H = \left[\frac{\text{Control} - (\text{Tratamiento} - \text{Blanco})}{\text{Control}} \right] * 100$$

6- Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CFM)

La CMF se determinó inoculando por picadura en agar PDA el ultimo pozo en el cual hubo crecimiento en la microplaca, y de los tres pozos siguientes que mostraron la inhibición completa del crecimiento de los hongos. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 120 h. La ausencia de crecimiento en el agar después del periodo de incubación indicó la inhibición completa del hongo en el pozo.

7- Perfil fitoquímico de las particiones obtenidas de *E. Tirucalli*

El perfil fitoquímico se determinó cualitativamente de acuerdo con Verde-Star et al. 2016

Tabla II.1. Pruebas fitoquímicas

Compuestos y grupos funcionales	Prueba	Desarrollo de la prueba	Interpretación
Grupo carboxilo	Bicarbonato de sodio	Agregar 100 µL de bicarbonato de sodio (10 %, p/p) a la solución*	La prueba es positiva si hay desprendimiento de burbujas de anhídrido carbónico
Grupo carbonilo		Agregar 100 µL del reactivo 2,4-DNFH (2, 4-dinitrofenilhidrazina) a la solución*	La prueba es positiva si se forma un precipitado amarillo, rojo o naranja
Taninos	Cloruro férrico	Añadir 100 µL del reactivo (5%, p/p en el etanol) a la solución *	La prueba es positiva si se observa una coloración verde oscura o negra
Esteroles y terpenos	Liebermann-Burchard	100 µL del reactivo de Liebermann-Burchard, que consiste en una mezcla de anhídrido acético (1 mL) , clorofórmico (1 mL) y ácido sulfúrico concentrado (0.1 mL), se añadió a la solución*	Una coloración roja indica la presencia de terpenos, mientras que una coloración azul indica la presencia de esteroides
Carbohidratos	Antrona	Suspender la partición (1 mg) en agua y agregar unas gotas de una solución de antrona (0.2 %, v/v) en ácido sulfúrico concentrado	La prueba es positiva si en la interfaz aparece un anillo azul-verdoso o violeta
Flavonoides	Shinoda	Agregar 100 µL de ácido clorhídrico concentrado y una o dos limaduras de Magnesio	Aparición de color rojo intenso: presencia de flavonoides, mientras que el color verde/azul: presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas
Alcaloides	Mayer	Agregar unas gotas de ácido clorhídrico a la solución*	La coloración azul indica la presencia de alcaloides
Sesquiterpenos	Baljet	Agregar unas gotas de la solución A y B a 3 mg de partición de disuelto en 1 mL de solvente	La coloración anaranjada o roja oscura indica la presencia de sesquiterpenos
Saponinas	Espumas	Disolver cada partición en 1 mL de agua y agitar	La aparición de espumas persistente indica la presencia de saponinas

Solución *: 1 mg de partición disuelto en 1 mL de disolvente de extracción.

Solución A: 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol.

Solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua

II.4 Resultados

1- Actividad antifúngica

Los resultados mostraron un efecto inhibitorio de las particiones metanólica y etanólica sobre el crecimiento de los aislados clínicos de dermatofitos. Se obtuvo una CMI de 125 $\mu\text{g/mL}$ frente a dos cepas dermatofíticas con la partición metanólica, mientras que con la partición etanólica se obtuvo una CMI de 125 y 500 ppm para *T. rubrum* y *T. interdigitalis*, respectivamente (Tabla II.2). No se produjo efecto inhibitorio en el crecimiento de los dermatofitos debido a los controles de solventes (metanol y etanol), de tal manera, no hay contribución a la actividad de las particiones empleadas. Por otro lado, se eliminó el efecto de la absorbancia del extracto, mediante el uso de un blanco en la fórmula, para evaluar la inhibición (Figuras II.1 y II.2).

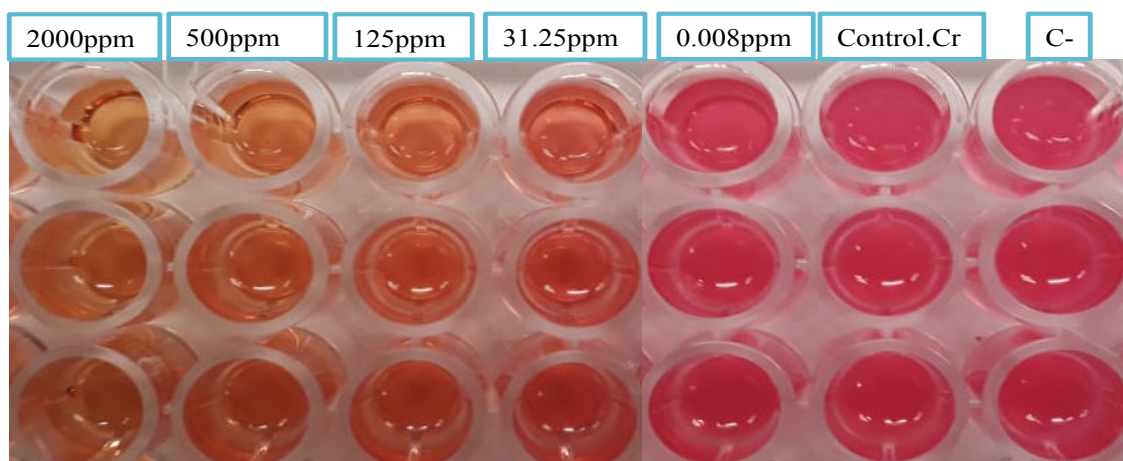


Figura II.1. Resultado de la sensibilidad *in vitro* de *T. rubrum* frente a la partición metanólica de *E. tirucalli*. Control.Cr: control de crecimiento, C-: Control negativo.

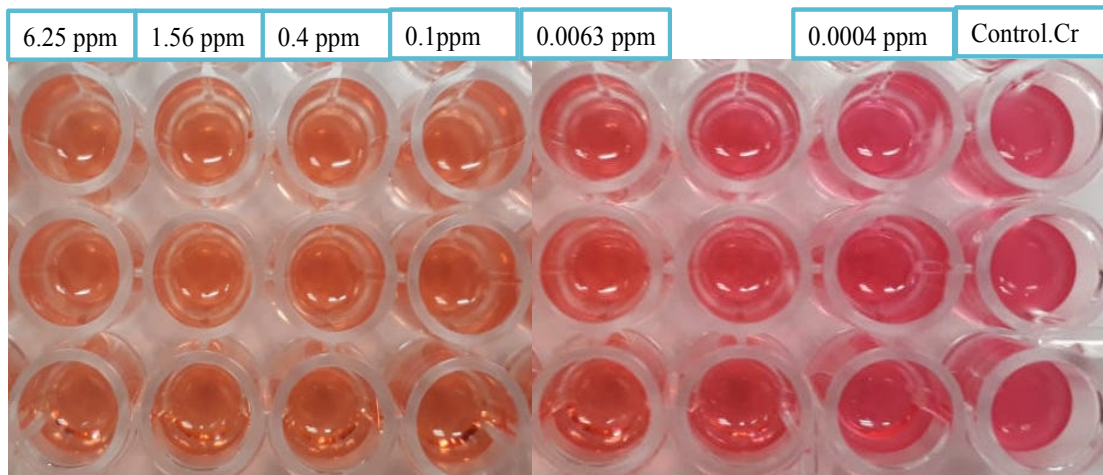


Figura II.2. Resultado de la sensibilidad *in vitro* de *T. rubrum* frente al clotrimazol. Cr: control de crecimiento

Se obtuvieron CMI iguales tanto en la partición etanólica como en la metanólica, frente a *T. rubrum*, mientras que se encontró una diferencia altamente significativa entre las CMI de estas mismas frente a *T. mentagrophytes*. Existe una diferencia significativa entre los tratamientos y los controles como lo muestra la prueba estadística de ANOVA (Tabla III.2).

Tabla 1: Actividad antidermatofítica de las particiones etanólica y metanólica frente a aislados clínicos de dermatofitos.						
Cepa de dermatofito	Concentración Mínima Fungicida (CMF) y Concentración mínima inhibitoria (CMI) en µg/mL					
	Partición metanólica		Partición etanólica		Clotrimazol	
	100%	80%	100%	80%	100%	80%
<i>Trichophyton rubrum</i>	500	125	>2000	125	0.4	0.1
<i>T. interdigitalis</i>	500	125	2000	500	0.1	0.0004
n= 3. Resultados expresados en µg/mL.						

2- Perfil fitoquímico

El perfil fitoquímico de las diferentes particiones obtenidas del *E. tirucalli* se recompilaron en la siguiente tabla.

Tabla II. 3. Perfil fitoquímico de particiones obtenidas de *E. tirucalli*.

Particiones	Hexánica	Clorofórmica	Etanólica	Metanólica
Grupo carboxilo	NA	NA	+	+
Grupo Carbonilo	NA	-	-	-
Taninos	-	+	+	-
Esteroles y triterpenos	+	+ (Esteroles)	+	+ (Esteroles)
Carbohidratos	NA	NA	+	+
Flavonoides	-	+	+	+
Alcaloides	NA	NA	-	-
Sesquiterpenlactonas	NA	+	-	+
Saponinas	NA	-	-	-
Amina				+
Presencia (+), ausencia (-) de los metabolitos secundarios. Insolubilidad de la partición (NA: no aplica).				

II.5 Discusión

Los datos epidemiológicos revelan que la prevalencia de la dermatofitosis permanece inalterada; siendo *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton interdigitale* las especies más frecuentes. El aumento de la incidencia de las infecciones crónicas y con fracaso terapéutico relacionado a las dermatofitosis ha despertado el interés de buscar soluciones alternativas para combatir estas enfermedades (Arenas 2002; Rudramurthy et al. 2018). Por tal motivo en el presente estudio, se determinó la sensibilidad *in vitro* de particiones obtenidas de *E. tirucalli* frente a aislados clínicos de dermatofitos, usando como control el clotrimazol. Hoy en día, es conocido el alto potencial que tienen los dermatofitos en desarrollar resistencia a los antifúngicos existentes (i.e. azoles); varios estudios reportaron que la prevalencia de resistencia de los dermatofitos hacia los azoles alcanzan el 19% en ciertas áreas del mundo. También, se ha reportado casos de resistencia de dermatofitos frente a las alilaminas (i.e. terbinafina)(Ghannoum 2016; Martinez-Rossi et

al. 2008; Rudramurthy et al. 2018). De acuerdo Ghannoum esta resistencia está relacionada al número limitado de agentes antifúngicos y el alto uso de los mismos para curar dichas infecciones (Ghannoum 2016). En el presente estudio se obtuvo que las particiones metanólica y etanólica tienen actividad antifúngica frente al aislado clínico de *T. rubrum* y *T. interdigitale* con una CMI de 7.8125 µg/mL y 500 µg/mL para la partición etanólica, y de 7.8125 µg/mL para la partición metanólica. Esta actividad biológica puede ser relacionado con el perfil fitoquímico de estas particiones, de acuerdo con estudios previos, los metabolitos secundarios tales como los flavonoides son los compuestos responsables de las actividades antimicrobianas en las plantas superiores. Además, se afirma que los metabolitos secundarios tales como los taninos y otros compuestos de naturaleza fenólica, se clasifican como compuestos antimicrobianos altamente activos (Mahomoodally et al. 2005).

Las particiones de extractos de *E. tirucalli*, revelaron la presencia de taninos, flavonoides, triterpenos, esteroides. Algunos autores reportan que dichos compuestos son biológicamente activos frente a diversos agentes microbianos responsables de enfermedades humanas tales como *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *A. Fumigatus*, *Candida albicans* (Bueno y Stashenko 2009; Cristian et al 2017; Enrique et al. 2011; Mahomoodally et al. 2005; Pandey 2007; Racero et al. 2004; Veloza et al. 2014).

Sin embargo, la CMI de las dos particiones fueron iguales frente a *T. rubrum*, lo que podría estar relacionado a la escasa diferencia en su perfil fitoquímico, dado que la partición etanólica mostró la presencia de taninos, flavonoides, triterpenos, esteroides, mientras que el perfil fitoquímico de la partición metanólica, además exhibió la presencia de sesquiterpenos.

Con respecto a los resultados obtenidos por Diogo Murion et al. 2014 la actividad antifúngica de estas particiones puede estar relacionado a la presencia de terpenos; dado que fue comprobado que los dermatofitos (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* y *M. canis*) tienen una sensibilidad considerable frente a monoterpenos (Miron et al. 2014). Según Khan y Rasool 1989 los terpenos presentes en las partes aéreas de *E. tirucalli* son específicamente teraxerano y el cicloeuordenol (Raasol et al. 1989; Khan y

al. 1988). Dado que la principal diferencia entre la partición etanólica y metanólica es la presencia de sesquiterpenos en la partición metanólica, la sensibilidad de *T. interdigitale* puede estar relacionado a dicho compuesto. Duong y sus colaboradores reportaron que el sesquiterpeno presente en las partes áreas de *E. tirucalli* es la tirucadalenona donde la posible sensibilidad de *T. interdigitale* frente a dicho compuesto (Duong et al. 2019). También, es importante mencionar que en estudio previo, se demostró que la partición metanólica de *E. tirucalli* tienen actividad antimicrobiana frente a *B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* and *C. albicans* (Prasad 2011).

Las particiones obtenidas de *E. tirucalli*, exhibieron también la presencia de metabolitos como flavonoides y taninos, compuestos generalmente reconocidos por su potencial antioxidante, antimicrobiano y su papel en la síntesis de colágeno; (Culebras y Tuñón 2002; S Aisah 2017) donde es posible la sinergia entre los compuestos presentes en dichas particiones frente a dichas cepas dermatofíticas. Sin embargo, el perfil fitoquímico de la partición hexánica reveló la presencia de esteroides y triterpenos, mientras que la partición clorofórmica de taninos, flavonoides, esteroides y sesquiterpenolactonas. Cabe mencionar que estudios previos reportaron la presencia en las partes áreas de *E. tirucalli* de esteroides (i.e. campesterol, estigmasterol, beta-sitosterol, isofucosterol y cicloartenol) triterpenos (i.e. taraxerano y cicloeuphordenol) taninos (i.e. tirucallina A) polifenoles (i.e. tirucallina B, euphorbina A, euphorbina F) y sesquiterpenos (i.e. tirucadalenona), compuestos reconocidos por su potencial anticancerígena antibacterial, antiviral, entre otros (Goutam et al. 2017).

II.6 Conclusión

En el presente estudio, se demostró el potencial antimicrobiano que tienen las particiones etanólica y metanólica de *E. tirucalli* L. sobre aislados clínicos dermatofíticos (*T. rubrum* y *T. interdigitalis*); se obtuvo que dichas particiones son potencialmente activas frente a los agentes etiológicos de interés, siendo la partición metanólica la que presentó mayor actividad biológica. Dichas actividades biológicas fueron relacionadas con el perfil fitoquímico las particiones; donde se pueden considerar los metabolitos secundarios de *E. tirucalli* L. como agentes antimicrobianos prometedores en el tratamiento y/o como coadyuvante en enfermedades ocasionadas por estos microorganismos.

CAPITULO III: ACTIVIDAD CITOPROTECTORA Y FOTOPROTECTORA DE EXTRACTOS DE *Euphorbia tirucall* L.

III.1 Resumen

En este trabajo, se determinó la actividad citoprotectora y fotoprotectora de particiones de *E. tirucalli* para su aplicación biológica. Mediante el modelo de *Artemia salina*, se obtuvo que las particiones metanólicas y etanólicas eran moderadamente tóxicas, con una DL_{50} de 144.77 y 189.54 ppm, respectivamente. La prueba de citoprotección reveló que son potencialmente citoprotectoras dosis-dependiente, alcanzando el 99% de citoprotección a 1000 ppm, lo cual se presume está relacionada con su contenido en polifenoles, respectivamente de 3.52 y 19.46 μg EAG/mg. La prueba de fotoprotección exhibió que estos últimos son fotoprotectores frente a las radiaciones UV-B, alcanzando un FPS > 9 y >18 ; lo que permite su aplicación como fotoprotectores biológicos.

III.2 Introducción

Diversas funciones vitales en el humano tales como la síntesis de la vitamina D, dilatación de los vasos superficiales, endurecimiento de la capa epidérmica y segregación de melanina, están asociadas con su exposición a la luz solar. Sin embargo, la sobreexposición a la radiación solar es altamente peligrosa, ya que está relacionada a una amplia gama de efectos nocivos en la piel, incluyendo quemaduras, cáncer y fotoenvejecimiento (Rhodes 1998).

El efecto negativo de la radiación solar es causada por la región espectral que se encuentra en el ultravioleta (UV), el cual se divide en tres regiones: las bandas UV-C (< 280 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-A (320-400 nm) (Baliga y Katiyar 2006; Skylar et al. 2013; Koh et al. 1996). Aunque solo el 5% del total de la radiación solar que alcanza la superficie terrestre se encuentra en la región UV-B, diversos estudios han reportado que la exposición a dicha radiación puede causar neoplasias, mutaciones, fotoenvejecimiento, inmunosupresión, cataratas oculares y fotosensibilidad (Wikonhai y

Brash 1999; Yaar y Gilchrest 1998; Nishgori et al. 1996; Sliney 1994; Stevanato et al. 2014).

México es un país que se encuentra en zona tropical cálida con una intensidad de la radiación UV alta, la cual puede producir quemaduras solares, eritema y descamación; de hecho, el índice UV varía de entre 6 y 12 durante el año (Sax 2000). Considerado este rango de índice UV significativamente alto o extremo, es muy necesario usar protectores solares.

Si bien se ha incrementado la disponibilidad de productos con compuestos capaces de filtrar la radiación solar (e.g. ácido *p*-aminobenzoico, salicilatos, benzofenonas), cada año, alrededor de un millón de personas son diagnosticadas con cáncer de piel y aproximadamente 10,000 mueren de melanoma maligno. La mayoría de los cánceres de piel ocurren en las áreas del cuerpo que están expuestas con mayor frecuencia al sol, como la cara, el cuello, la cabeza y el dorso de las manos (Alvarez-suarez et al. 2012), esto podría relacionarse a la capacidad protectora limitada de dichos compuestos; se ha reportado que el uso excesivo o en alta concentración de dichos filtros, puede aumentar el riesgo de dermatitis de contacto o de fotocontacto (Reuter et al. 2010). Por ello, se requieren soluciones alternativas como el uso de protectores solares biológicos, los cuales pueden proporcionar más protección frente a la radiación solar y apoyar al sistema natural de defensa del cuerpo. Dado que los antioxidantes son capaces de prevenir o revertir los efectos nocivos causados por la radiación solar, en el área de la salud surge gran interés en desarrollar nuevos productos con principios activos de origen botánico que presenten actividad antioxidante (Reuter et al. 2010; Leos-Rivas et al. 2016).

Además, es importante indicar que los fotoprotectores a base de productos sintéticos se degradan después de un tiempo prolongado de exposición al sol, por lo que su efecto protector puede verse disminuido (Botta et al. 2014). Por otra parte, la exposición a la radiación UV puede inducir a la producción de radicales libres (Yi Os et al. 2017), por lo tanto, resulta relevante el uso de productos capaces de jugar ambos papeles (i.e. fotoprotección y citoprotección) para apoyar al sistema natural de defensa del cuerpo humano.

Euphorbia tirucalli es una planta arbustiva nativa de África, comúnmente es llamada dedos de lápiz y es altamente usada en medicina tradicional contra tumores, excrecencias, nódulos y abscesos (Gupta et al. 2013). En un estudio realizado por Upadhyay et al. 2010 se demostró que los extractos alcohólicos de la corteza del tallo y las hojas de *E. tirucalli* presentan actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida tropicalis*, *C. albicans* y *A. Niger* (Upadhyay et al. 2010). Por su parte, Gupta et al reportaron que los extractos de acetona, hexano, metanol, cloroformo y éter de petróleo del tallo de *E. tirucalli* presentaban actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Bacillus megaterium* (Gupta et al.2013). Por otro lado, Aisah et al comprobó, en un estudio *in vivo* en ratas, que el extracto etanólico de esta planta promueve la cicatrización de quemaduras (Aisah et al. 2018).

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad citoprotectora (i.e. antioxidante) sobre eritrocitos humanos y el efecto fotoprotector de extractos obtenidos de *E. tirucalli* a fin de evaluar su potencial como dermatoprotector botánico.

III.3 Materiales y Métodos

1. Prueba de toxicidad en eritrocitos humanos

Preparación de la solución madre. En un tubo cónico de 1.5 mL de capacidad, se colocaron 50 mg de la partición por analizar con 1 mL de metanol y se mezcló por sonicación.

Solución de eritrocitos. Se utilizó sangre humana obtenida por punción venosa de un donador voluntario y se recolectó en tubos con EDTA. La muestra de sangre fue conservada durante 24 h a 4°C y, posteriormente, se separaron sus componentes por centrifugación durante 10 min a 1000 rpm. El paquete celular fue lavado tres veces usando una solución amortiguadora de fosfatos (NaCl, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ a pH=7,4). El paquete celular se recuperó por centrifugación y con él se preparó una suspensión de eritrocitos al 5% (SER) con PBS para la prueba de hemólisis y otra al 10% para la prueba de citoprotección. Ambas suspensiones fueron preparadas inmediatamente antes de cada ensayo.

2. Prueba de hemólisis

A partir de la solución madre de la partición por analizar (50 mg/mL), se tomaron volúmenes de 25, 20, 15, 10, 5 y 2.5 µL que fueron colocados en tubos cónicos de 1.5 mL. A cada tubo se le adicionó el volumen necesario de PBS para completar un volumen final de 1mL. Posteriormente, se añadieron 250 µL de la SER a cada tubo, obteniéndose así concentraciones finales de la partición de 1000 a 100 ppm. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Los blancos se prepararon con la partición correspondiente en la solución de PBS. Además, los controles de los disolventes se prepararon sustituyendo los volúmenes de la partición por los volúmenes correspondientes del disolvente, diluyendo después con PBS hasta obtener volúmenes finales de 1 250 µL. Finalmente, se usó agua destilada como control positivo y la PBS como control negativo. (Figura III.1)

Los sistemas preparados se incubaron a temperatura ambiente por 30 min y, posteriormente, se centrifugaron a 3 500 rpm por 3 min a 4°C. Un volumen de 200 µL del sobrenadante de cada sistema se colocó en una microplaca de 96 pozos y se midió su absorbancia a $\lambda = 550$ nm (Bio-tek elx800). El porcentaje de hemólisis (%h) se determinó mediante la siguiente fórmula¹¹:

$$\%h = \frac{[Abs(x) - Abs(-)]}{[Abs(+) - Abs(-)]} * 100$$

Abs (x): absorbancia a de la partición a una concentración dada, obtenida a 540 nm.

Abs (-): absorbancia del control negativo a 540 nm.

Abs (+): absorbancia del control positivo a 540 nm.

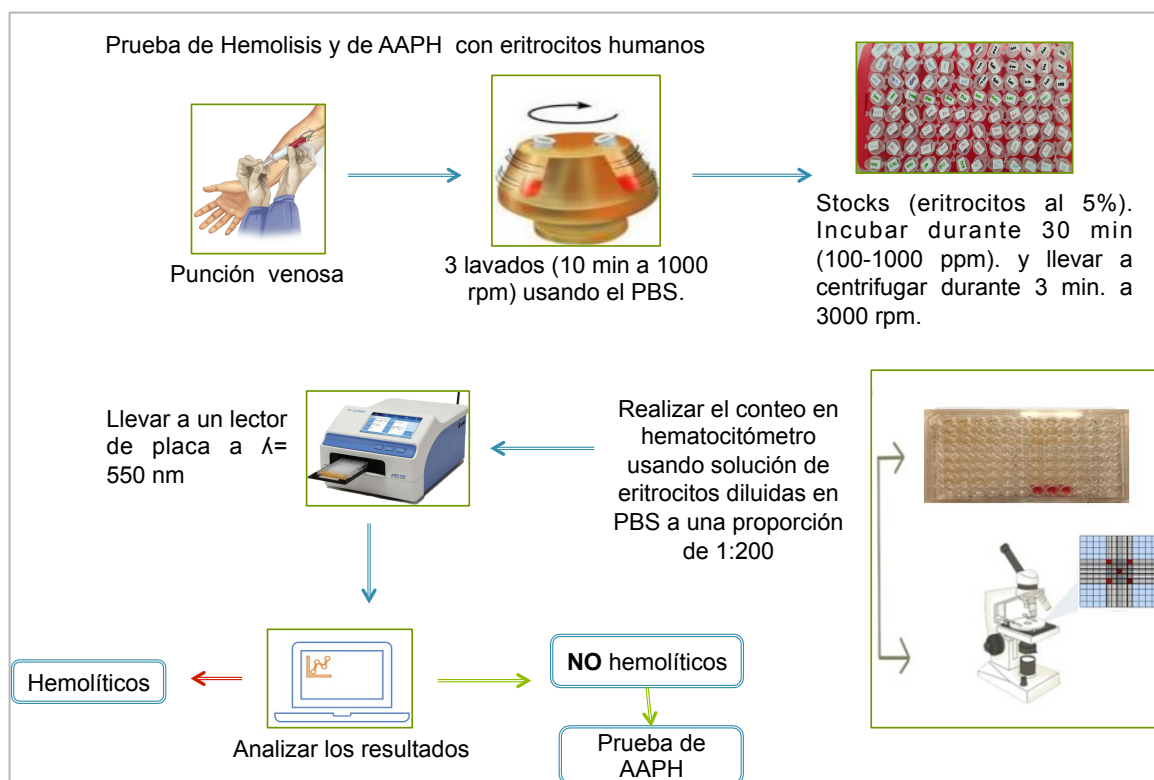


Figura III.1. Prueba de toxicidad y citoprotección sobre eritrocitos Humanos.

3. Prueba de toxicidad sobre *Artemia salina*

El bioensayo se realizó según el método descrito por Leos-Rivas et al. 2016(Figura III.2). Para ello, se colocaron 10 nauplios con 100 μ L de solución salina en los pocillos de una microplaca de 96 pozos. Se adicionaron 100 μ L de la partición por analizar (i.e. metanólica o etanólica) a una concentración inicial de 1 900 ppm a fin de realizar diluciones seriadas con concentraciones de 475 a 0.232 ppm. Al cabo de 24 h de contacto con las particiones, se realizó el conteo de nauplios muertos. La determinación de la Dosis Letal 50 (DL_{50}) se obtuvo estadísticamente por regresión lineal en PROBIT, utilizando el programa SPSS V 20®.

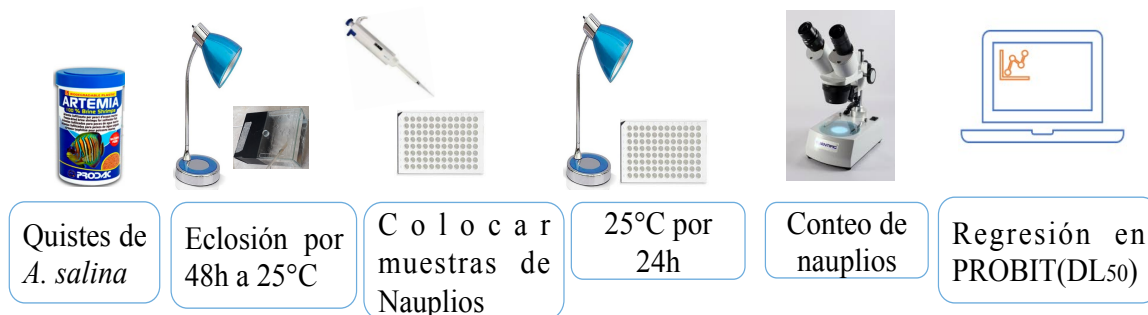


Figura III.2. Prueba de toxicidad de las particiones de *E. tirucalli* sobre *A. salina*.

4. Prueba de citoprotección

La actividad antihemolítica de las particiones etanólica y metanólica de *E. tirucalli* se determinó mediante la prueba de AAPH•. Brevemente, la SER se expuso al reactivo de AAPH• en presencia de diferentes concentraciones de la partición a evaluar, incubándose a 37°C durante 150 min en agitación constante. En seguida, la mezcla se centrifugó a 3 000 rpm por 3 min a 4°C y el sobrenadante (200 µL) se colocó en una microplaca de 96 pozos; finalmente, se midió la absorbancia a $\lambda = 540$ nm (Bio-tek elx800). Se usó como control positivo una mezcla de SER, PBS y AAPH•, mientras que, como control negativo se empleó una mezcla de PBS y SER. Dado que las particiones empleadas fueron disueltas en metanol, también se realizó una prueba enfrentando los eritrocitos con el reactivo de AAPH• en presencia de volúmenes de metanol proporcionales a las concentraciones de las particiones. Para los blancos con extractos, se empleó una mezcla de PBS y la partición correspondiente, obteniendo concentraciones finales de 100 a 1 000 ppm. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

El porcentaje de citoprotección se determinó mediante la siguiente fórmula (Alvarez-suarez et al. 2012):

$$\%C = \left[1 - \frac{[Abs(x) - Abs(-)]}{[Abs(+) - Abs(-)]} \right] * 100$$

Abs (x): absorbancia a de la partición a una concentración dada, obtenida a 540 nm.

Abs (-): absorbancia del control negativo a 540 nm.

Abs (+): absorbancia del control positivo a 540 nm.

5. Factor de protección solar de particiones crudas de *E. tirucalli*

El Factor de Protección Solar (FPS) se determinó mediante el método descrito por Mansur y sus colaboradores (Mensur et al. 1986). Se preparó una solución madre de 1 mg/mL de cada partición (i.e. metanólica o etanólica), a partir de la cual se obtuvieron disoluciones con concentraciones de 0.25, 0.2, 0.15, 0.1 y 0.05 mg/mL. Las absorbancias de cada sistema se midieron en el intervalo de longitud de onda del UV-B de 290 a 320 nm en un espectrofotómetro de barrido (UNICO, SQ-2800), con incrementos de 5 nm. Se usó como blanco metanol, y como control positivo benzofenona (Sigma-Aldrich). El ensayo se realizó por triplicado. La FPS se calculó mediante la fórmula:

$$FPS = CF \sum_{290}^{320} EE(\lambda) * I(\lambda) * Abs(\lambda)$$

Tabla III.1. Constantes $EE(\lambda) * I(\lambda)$ definidas por Sayre et al., 1978 para el cálculo de la FPS

λ	290	295	300	305	310	315	320	Total
$EE(\lambda)$	0.0150	0.0817	0.2875	0.3278	0.1864	0.0839	0.0180	1
$* I(\lambda)$								

Donde, FPS= Factor de Protección Solar, CF (factor de corrección) = 10, $EE(\lambda)$ = Efecto eritemogénico de la radiación de longitud de onda λ . $I(\lambda)$ = Intensidad del sol en la longitud de onda λ ; $Abs(\lambda)$ = Absorbancia de la solución en la longitud de onda λ .

6. Contenido en fenoles totales

El contenido de fenoles totales en las particiones se determinó de acuerdo con el método descrito por Shahidi y Naczki en 1996. Los experimentos se realizaron por triplicado en un sistema de macrodilución, realizando previamente una curva de calibración usando ácido gálico como estándar en un intervalo de concentraciones de 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Para el análisis de cada partición, se tomaron 250 μL de una solución madre de la partición (0.2 mg/mL) y se les añadió 750 μL de metanol, obteniendo una concentración final de 0.05 mg/mL. A esta solución se le agregó 6 mL de metanol y, posteriormente, 500 μL del

reactivo Folin-Ciocalteu, dejando incubar por 5 min en oscuridad. En seguida, se agregaron 1.5 mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3 , al 20%) para ajustar el pH a un valor de 10. Se llevó a un aforo de 10 mL y se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente. Después de 2 h se midió la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm (Espectrofotómetro Beckman Coulter DU[®]650). Se utilizó como blanco una mezcla de metanol, Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio. El contenido fenólico total se expresó en microgramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto ($\mu\text{g EAG/mg E}$).

7. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados en el programa SPSS V 20[®] vía el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, para comprobar que existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos y para comparación de medias (homogeneidad entre los tratamientos), respectivamente. Las respuestas al tratamiento fueron considerados significativamente diferentes con una $p < 0.05$.

III.4 Resultados y discusiones

1. Prueba de toxicidad en eritrocitos humanos

El ensayo de hemólisis se realizó exponiendo eritrocitos humanos a las distintas particiones de *E. tirucalli*. Como puede observarse en la Figura III.3, el efecto hemolítico de las particiones fue dosis dependiente. A concentraciones menores o iguales a 100 ppm, prácticamente, ninguna de las particiones presentó efecto hemolítico. Las diferencias en el efecto hemolítico de las particiones fueron más evidentes a partir de 600 ppm. Por ejemplo, a 1000 ppm, la partición hexánica mostró el mayor efecto hemolítico ($\sim 50\%$), seguida de la partición clorofórmica con el 10% de dicho efecto; las particiones metanólica y etanólica mostraron los menores efectos hemolíticos ($< 5\%$) a esta misma concentración. La prueba de ANOVA ($\alpha = 0.00$) demostró que existía una diferencia significativa en los efectos hemolíticos a las distintas concentraciones. Además, la prueba de Tukey ($p = 0.05$) reveló que existe una homogeneidad entre los efectos de los tratamientos con las particiones (i.e. clorofórmica, metanólica y etanólica) y los controles

(i.e. negativo y metanol) a concentraciones iguales o menores a 600 ppm. Lo que indica que se podría aprovechar los efectos biológicos benéficos de dichas particiones (i.e. etanólica, metanólica y clorofórmica) en humanos, sin presentar un potencial riesgo. De acuerdo con Sylwia Cyboran et al. 2012 y Lux et al. 2005, la prueba de citotoxicidad en eritrocitos humanos permite inferir que un daño en su membrana celular se correlacionaría con una alta probabilidad de que otras células más complejas, y con mayor cantidad de organelos sean susceptibles al daño en su sistema membranar.

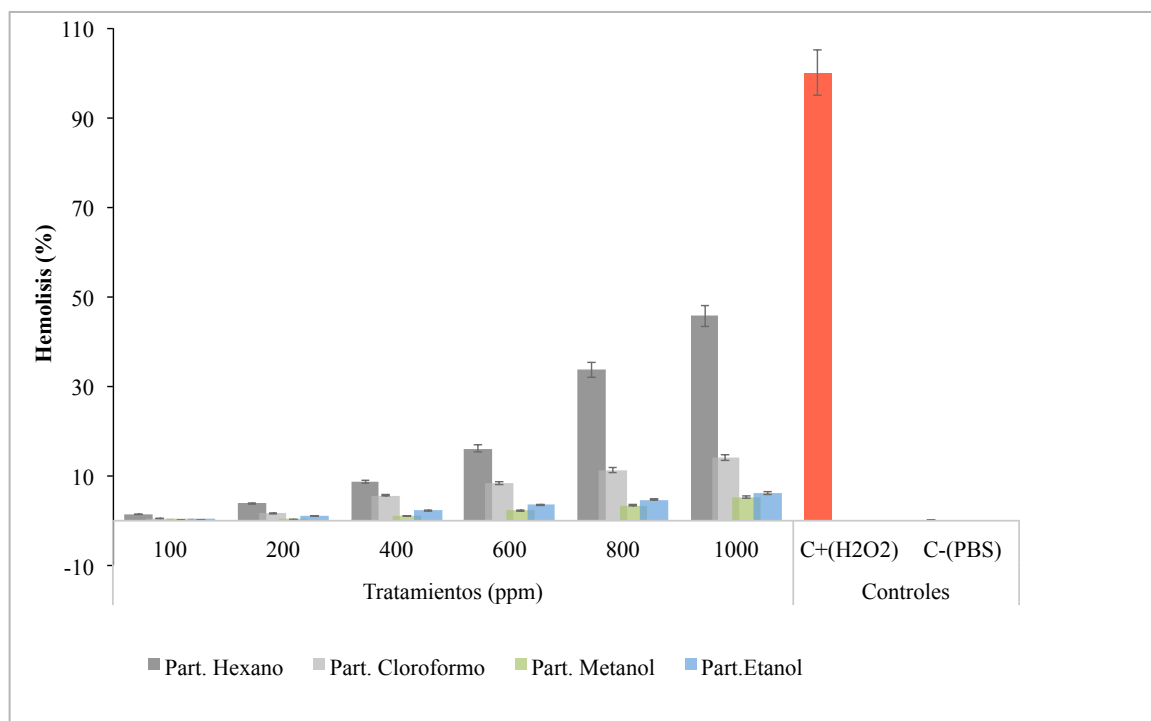


Figura III.3: Efecto hemolítico de la concentración de las particiones obtenidas de *E. Tirucalli*.

2. Toxicidad sobre *A. salina*

El estadístico de regresión en PROBIT exhibió que las particiones con metanol y etanol fueron “moderadamente tóxicas” según la CYTED (Gupta 1995), con DL_{50} de 189.54 y 144.77 ppm, respectivamente. Este comportamiento pudo deberse a que los extractos del presente estudio no mostraron evidencia de la presencia de alcaloides, los cuales frecuentemente están asociados a la toxicidad de extractos vegetales (Azzeme et al. 2019). La toxicidad moderada de las particiones metanólica y etanólica sobre la *A. salina* implica que se puede aprovechar el potencial farmacológico de estos últimos para el

tratamiento de padecimientos en humano, a reserva de aplicar otros ensayos toxicológicos más extensos (McLaughlin et al. 1998).

3. Prueba de citoprotección

Dado que las particiones metanólica y etanólica resultaron con los menores porcentajes en el ensayo de hemólisis, en seguida, se evaluó su efecto citoprotector en eritrocitos humanos contra la hemólisis inducida por el radical AAPH•. Brevemente, la suspensión de eritrocitos (10%) se expusieron al AAPH por 2 h 30 min a 37°C bajo agitación moderada. Como se puede apreciar en la Figura III.4, el efecto citoprotector de las dos particiones fue efectivo a concentraciones ≥ 200 ppm, evitando totalmente la hemólisis. A partir de 100 ppm, se observó una disminución del efecto citoprotector de ambas particiones, obteniendo valores de 55 y 35% para la etanólica y metanólica, respectivamente. Con respecto a los controles, el AAPH• indujo 100% de hemólisis en el control positivo (SER + PBS + AAPH), mientras que el control negativo (SER + PBS) no presentó hemólisis. El análisis de ANOVA mostró que existe una diferencia significativa ($\alpha = 0.00$) entre los tratamientos (i.e. particiones y controles ($\alpha = 0.00$)) y la prueba de Tukey mostró que existe una homogeneidad entre el efecto de los tratamientos de 200 a 1000 ppm (citoprotección $> 95\%$). El efecto citoprotector pudo deberse a la presencia de taninos y flavonoides en las particiones. En estudios previos se ha reportado que los polifenoles son potenciales antioxidantes (Alvarez-suarez et al. 2012; Chaudhui et al. 2007; Martinez-Flórez et al. 2002; Zhang et al. 2014). La baja citoprotección a 100 ppm puede estar relacionada a la baja concentración del tratamiento³⁰.

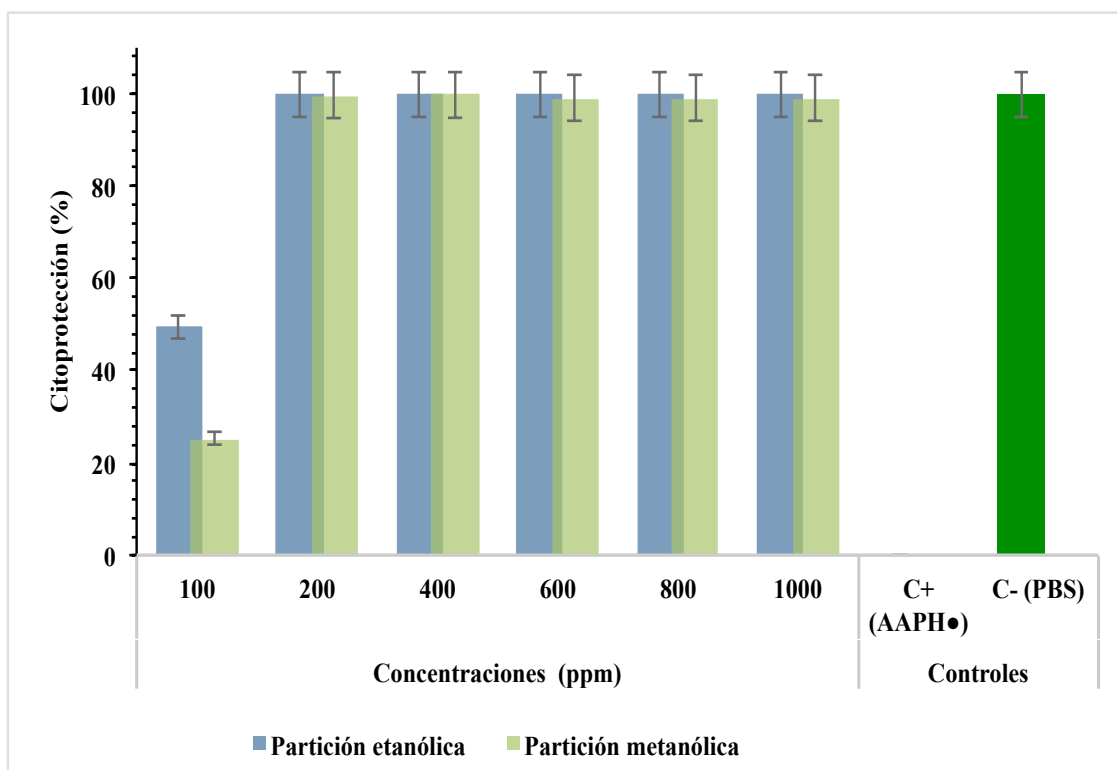


Figura III.4. Efecto citoprotector en eritrocitos humanos en función de la concentración de las particiones etanólica y metanólica de *E. Tirucalli*.

4. Factor de protección solar

Aunque existen varios factores extrínsecos (e.g. contaminación, productos químicos) que pueden perjudicar la salud de la piel, se ha reportado que la exposición a la radiación UV es la principal causa de cáncer cutáneo y envejecimiento celular (Amores et al. 2018). Además, la radiación solar es considerada como la mayor fuente de producción de radicales libres en el cuerpo, provocando estrés oxidativo. Particularmente, las radiaciones UV-B son capaces de generar mutagénesis, carcinogénesis y senescencia celular, ya que actúan directamente en el ADN celular (Chen et al. 2012).

En el presente estudio, se determinó el potencial fotoprotector de las particiones metanólica y etanólica de *E. tirucalli*, mediante el método *in vitro* descrito por Mansur (mansur 1980), usando como control positivo a la benzofenona (Sigma-Aldrich). Como se muestra en la Figura 3, a 250 $\mu\text{g/mL}$, ambas particiones presentaron efecto fotoprotector frente a las radiaciones UV-B. El FPS fue de 9.25 para la partición metanólica y 18.42 para la etanólica, mientras que para la benzofenona fue de 5.4 (Figura

III.5). La prueba de ANOVA exhibió que existe una diferencia significativa entre los tres tratamientos, con un nivel de significancia de 0.00. En particular, el extracto etanólico fue el que presentó el mayor factor de protección solar, alcanzando más del triple de protección comparado con la benzofenona (de 100 a 250 $\mu\text{g/mL}$). También, se obtuvo mayor FPS con el extracto metanólico comparado al control positivo. De acuerdo con Ramos e Ivonne (Ramos y Ivonne 2010), el potencial fotoprotector de dichos extractos podría ser relacionado a su contenido polifenoles, ya que fueron puestos en evidencia en su el perfil fitoquímico que se les realizó. La presencia de dichos compuestos contribuye a explicar porque el factor de protección solar de la partición etanólica fue prácticamente el doble que el factor de la partición metanólica. La partición etanólica presentó un mayor contenido en polifenoles totales (19.46 $\mu\text{g EAG/mL}$) en comparación con la partición metanólica (3.52 $\mu\text{g EAG/mL}$).

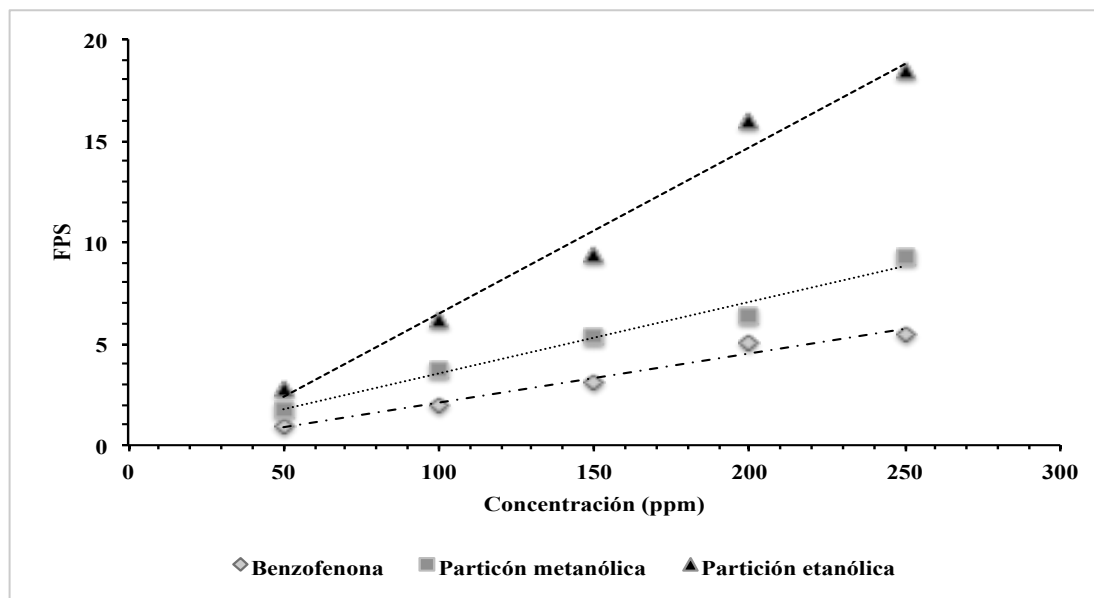


Figura III.5. Factor de protección solar (FSP) frente a las radiaciones UV-B (290-320 nm) de las particiones metanólica y etanólica, usando como control positivo la benzofenona a diferentes concentraciones con respecto a los extractos.

5. Fenoles totales

La cuantificación de los fenoles totales se realizó usando como referente una curva de calibración de ácido gálico, la cual se cita a continuación:

$$Abs = 0.0171Con. \acute{a}c. gal - 0.0042$$

donde, “*Abs*” es la la absorbancia y “*Con. ác. gal*” la concentración de ácido gálico.

Los resultados exhibieron que la partición etanólica tuvo mayor contenido en polifenoles totales, con una concentración de 19.4588 µg EAG/mg de extracto, mientras que para la partición metanólica fue de 3.52 µg EAG/mg de extracto. Dicho resultado puede ser relacionado por la presencia de taninos (Tirucallina A) y flavoindes en la partición etanólica, mientras que la partición metanólica exhibió únicamente la presencia de flavoides, como referencia a los polifenoles; estos compuestos, son generalmente considerados como potenciales antioxidantes con capacidad de eliminar aniones superóxido y radicales hidroxilo. Cabe señalar que de acuerdo con algunos autores, los taninos presentes en el extracto etanólico de *E. tirucalli*, tienen potencial cicatrizante, el cual puede considerarse como un efecto biológico positivo adicional de las particiones para su aplicación en la piel (Aisah et al. 2018: Goutam y Sadhan 2017).

III.5 Conclusiones

Las pruebas sobre eritrocitos humanos revelaron que las particiones metanólica y etanólica no son hemolíticas pero potenciales citoprotectores a dosis-dependiente. Con respecto a la actividad fotoprotectora, ambas particiones exhibieron un factor de protección solar superior al control positivo (Benzofenona). Estas actividades biológicas en conjunto pueden revelar que es probable que la aplicación tópica de particiones de *E. tirucalli* puedan ayudar al sistema natural de renovación del cuerpo humano debido su efecto citoprotector. Estas actividades biológicas se sumarían a las anteriormente reportadas para extractos de la parte área de *E. tirucalli*, por ejemplo, la antimicrobiana y su efecto promotor de síntesis de colágeno (Aisah et al. 2018). Sin embargo, debido a los resultados del modelo de *A. salina*, se tienen como perspectivas ampliar los ensayos de toxicidad para descartar algún efecto no deseado cuando sea aplicado tópicamente.

CAPÍTULO IV: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRACTO FORMULADO EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS Y DESARROLLO DE NUEVO ENFOQUE DE CUANTIFICACIÓN MEDIANTE FT-IR.

IV.1. Resumen

Una amplia gama de estudios han demostrado la eficacia de los fitoconstituyentes de los extractos de plantas como alternativa prometedora en la cura de enfermedades humanas. Sin embargo, la aplicación de dichos activos mediante formas de dosificación convencionales limita su efectibilidad farmacológica, afectando así su biodisponibilidad, solubilidad, absorción, estabilidad. El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de la partición metanólica de *E. tirucalli* encapsulado en nanopartículas poliméricas usando la Eudragit S100 como polímero. La cuantificación del extracto encapsulado se realizó mediante el método de espectroscopía de infrarrojo, empleando la banda de absorción correspondiendo al grupo N-H entre 1640-1500 cm⁻¹, grupo que marcó la diferencia entre el extracto y el polímero de encapsulación. Para la curva de calibración, se empleó un rango de concentración de 100 a 3000 µg/mL, rango en el cual se obtuvo una de linealidad con un R² de 0.98 y 0.99 con el área de bajo la curva y el punto más alto, respectivamente. Con respecto a las nanopartículas poliméricas cargadas con la partición metanólica de *E. tirucalli*, los cinco lotes empleados no presentaron diferencia significativa en sus características físicas; el tamaño varió entre 90.257±0.935 y 93.737 ± 1.285, el IPD entre 0.125±0.001 y 0.187±0.006, el potencial Z, entre 5.45±0.435 y -7.797±1.150 (*p*>0.05). Con respecto la cuantificación del extracto formulado, se solubilizaron las pastillas de nanopartículas cargadas con el extracto vegetal en 0.5 mL de metanol; posteriormente se procedió el análisis por espectroscopía de infrarrojo de todos los lotes de interés. Se obtuvo que los lotes presentaron un porcentaje de encapsulación bajo de 2.86 a 3.13%, resultado que se correlaciona con la eficacia de encapsulación. Finalmente se obtuvo que la Nanopartículas cargadas con extracto de *Euphorbia tirucalli* tiene un potencial antifúngica frente a aislados clínicos de

Tricophyton rubrum y *T. interdigitalis* con una Concentración Mínima Inhibitoria de 55.55 y 0.1 µg/mL respectivamente.

IV.1. Introducción

Las infecciones fúngicas están causadas por una amplia variedad de hongos capaces de afectar la salud humana a diferente nivel de su anatomía (tópica, profunda y sistémica). Aun que dichas infecciones afectan en menor proporción los pacientes sanos, no es los mismo con pacientes que presentan enfermedades crónico-degenerativa (SIDA, diabetes, cáncer, etc.) o con el sistema inmune debilitado (pacientes con trasplante de órganos), ya que pueden afectar de forma negativa la vida (fatal) de este rango huéspedes (Garza-Garza y Ocampo-Candiani 2014; Bonifaz 2016; Arenas y Moreno 2010). En lo que es de las infecciones dérmicas causadas por hongos, tenemos las que están causadas por (i) dermatofitos que se manifiestan clínicamente como tiñas; (ii) levaduras, que se manifiestan como dermatosis por candida y pitiriasis versicolor; y (iii) hongos filamentosos no-dermatofitos, que se manifiestan como tiña negra e infecciones de la placa ungueal en humanos (Bonifaz 2015; Bonifaz 2008; Havlickova 2008). Las infecciones micóticas de la piel provocan un cambio del pH de la piel, enrojecimiento, inflamación y descamación en el sitio de la infección, lo que altera la barrera que ofrece la piel. La infección cutánea por hongos es la infección de la capa epidérmica y se denomina dermatomicosis (Watanabe 2008).

Por otro lado, el uso de las plantas con fines terapéuticos se remonta desde hace más de 10 mil años con evidencia en la lucha contra enfermedades humanas (Yasilada 2005). Hoy en día, se reconoce que las plantas contienen metabolitos secundarios de importantes para curar o prevenir patologías humanas. Es importante mencionar que estudios previos reportaron que las plantas medicinales poseen actividad farmacológicas tales como actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante, analgésico, entre otras (Andrea et al. 2016; Cristian et al. 2017; Rivas-Morales et al. 2016; Pérez-Narváez et al 2019; Prabha et al. 2008). En la actualidad, los medicamentos en base a plantas medicinales están tomando mucha popularidad, por lo mismo que dichas plantas se usan en la medicina popular; sin embargo, es importante mencionar que

la dosificación de dichas fuentes medicinales se hace generalmente de forma tradicional o de forma convencional (geles, lociones, cremas) (Hamishekhar et al. 2013). Estudios previo reportan que esta forma de aplicación presenta una amplia gama de desventaja, tales como la baja biodisponibilidad del principio activo, baja solubilidad, la baja absorción, baja estabilidad, limitando así la efectividad terapéutica del principio activo vía el cambio de la concentración terapéutica deseada. De acuerdo con Hamishekhar et al. 2013, la clave para una administración tópica eficiente es prevenir o reducir la difusión del fármaco en la circulación sistémica y dirigir el fármaco a una capa cutánea específica. Por lo tanto, se están desarrollando formas de dosificación más efectivas a partir de nanopartículas poliméricas para mejorar el sistema de entrega de principio activos limitando así las fallas terapéutica (Kaur y Kakkar 2010), efectos adversos e invasión del fármaco.

El objetivo del presente trabajo consistió en determinar la actividad antifúngica de extracto matanólicos de *Euphorbia tirucalli* formulados en nanopartículas poliméricas sobre aislados clínicos de dermatofitos.

IV.2. Materiales y Métodos

Reactivos. Se utilizó la Eudragit S100 como polímero formador de las NP, particiones de extractos de *E. tirucalli* como principio activo, Metanol y etanol grado analítico (Sigma-Aldich) como disolventes, tween 80 al 1% como estabilizador de las nanopartículas.

Elaboración de las nanopartículas poliméricas (NP). Las NP se prepararon mediante el método de nanoprecipitación de Armendáriz-Barragán et al. 2016. Inicialmente se prepararon las dos fases de síntesis, una fase orgánica (FO) compuesta de una mezcla solvente, Eudragit S100 y extracto de *E. tirucalli*, y una fase acuosa (FA) compuesta de tween 80 al 1%. En efecto, para la preparación de las NP, se inyectó la FO en la FA anteriormente en agitación magnética constante, lo que permite la agregación del polímero, atrapando el extracto en su interior y dejando así en suspensión las NP en la FA. Posteriormente, la suspensión dicha suspensión fue sometida a una evaporación a presión reducida usando un rotavapor para separar el solvente del lote de nanopartículas.

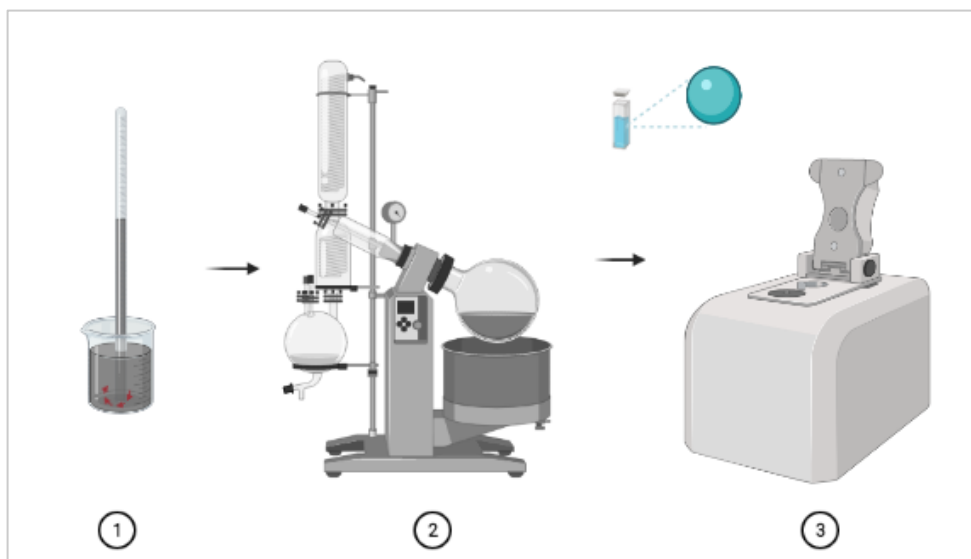


Figura IV.1. Síntesis de nanopartículas poliméricas por método de nanoprecipitación. (1) Inyección de la FO en la FA; (2) Liberación de la suspensión de NP del disolvente (MeOH/EtOH); (3) Determinar las características físicas de las NP.

Caracterización física de las NP. Dichas características se obtuvieron por espectroscopia de correlación fotónica, en lo que es del tamaño y el índice de polidispersibilidad (PDI), con respecto al potencial Z, se determinó por microelectroforesis con láser Doppler en un Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA).

1. Cuantificación de nanopartículas cargadas con partición de *E. tirucalli* (NP-Ext) por espectroscopía infrarroja.

Se utilizó un espectrofotómetro convencional FTIR Bruker IFS 66 con digitalización de espectros que permite obtener archivos electrónicos de los análisis. En efecto, dicho método implica una etapa de:

Selectividad. En esta etapa, se analizó la refractancia total del extracto, surfactante (tween 80) y polímero de formación de la NP con la finalidad de identificar el grupo funcional mayoritariamente presente en la partición/extracto y ausente en el excipiente y el polímero formador.

Linealidad. Se determinó mediante la ley lambert-Beer que estipula que la intensidad de absorbancia de una sustancia es proporcional a su concentración. Por lo que se tomó la absorbancia de las particiones disueltos en metanol/etanol a diferentes concentraciones

(100-3500 µg/mL) con el fin de determinar el rango de linealidad de la absorbancias versus concentración. Los espectros infrarrojos se registraron en el rango de 4000–400 cm⁻¹, a resolución de 4 cm⁻¹ y 64 barridos por espectro. El área de bajo la curva y altura de la banda ubicada a 1604 cm⁻¹ se emplearon como variables cuantitativas para la obtención de curva de calibración y la R-cuadrada. Para dicha banda, la línea de base se corrigió en el rango de 1640-1550 cm⁻¹; luego, se midió la altura máxima de la banda en el misma área, y se usaron para construir las curvas analíticas y para la determinación del porcentaje de extracto encapsulado.

Precisión y exactitud del extracto. Esta etapa se realizó el análisis IR de los límites de la curva de calibración (100, 3000 µg/mL), tratamiento de las pastillas y se procesaron los datos obtenidos. En efecto, se analizaron 6 soluciones estándares de cada limite y a la concentración de 1000 µg/mL correspondiendo a la concentración teórica de las NP-Ext.

Tratamiento y análisis de las pastillas de NP. Se procedió inicialmente la obtención de las pastillas de NP-Ext posterior a la centrifuga de los lotes de NP a 25 000 rpm durante 2h 30 min; posteriormente, se eliminó el sobrenadante y las pastillas se conservaron a temperatura ambiente hasta sequedad a temperatura ambiente.

Cuantificación del extracto incorporado en las nanopartículas. Los lotes de NP-Ext se disolvieron en 0.5 mL de metanol, Posteriormente, las soluciones se analizaron por el método FT-IR. Finalmente, se determinó la eficiencia de encapsulación (% EE) y el porcentaje de encapsulación (% E) en base a las siguientes fórmulas:

$$\%EE = \frac{(\mu g) \text{ de extracto en lote de NP-Ext}}{2 * (\mu g) \text{ de extracto en la FO}} * 100 \quad (1)$$

$$\%E = \frac{(\mu g) \text{ de extracto cuantificado en NP}}{(\mu g) \text{ de polimero empleado}} * 100 \quad (2)$$

2. Actividad antifúngica

Preparación de inóculos. Las cepas fueron activadas inicialmente en agar papa dextrosa (PDA), durante 21 d a 28°C. Posteriormente, las colonias fúngicas fueron cubiertas con 10 mL de agua destilada estéril, y se rasparon suavemente las superficies con un asa

estéril; las mezclas obtenidas fueron posteriormente filtradas con una gasa estéril, para separar las conidias de las hifas y partículas de agar. Antes de realizar las pruebas biológicas, las suspensiones de conidias fueron ajustadas a una concentración de 1 a 3 x 10⁴ UFC/mL después de un conteo en un hematocitómetro.

Prueba biológica. La sensibilidad antifúngica *in vitro* se determinó mediante una modificación del método de microdilución descrito en el protocolo de M38-A por el Clinical and Laboratory Standards Institute, usando (CLSI, M38-A2 2008). En efecto, a partir de los lotes obtenidos, se realizaron diluciones seriadas en microplacas de 96 pozos a fondo plano, usando como diluyente el caldo Müeller-Hinton con rojo fenol como indicador de pH. Posteriormente, se agregaron 100 µL de solución de conidias; se usó como control positivo clotrimazol (Sigma-Aldrich). Como blanco, se utilizaron lote de nanopartículas no cargadas con extracto, sin inóculo; se usó uno tween 80 al 1% como control negativo, mediante el mismo sistema, con inóculo. Con respecto al control de crecimiento, se inocularon 100µL de cada cepa en 100 µL de medio. Las mezclas obtenidas se incubaron a 28°C durante 120 h.

La actividad antifúngica se determinó mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida según la CLSI como aquella concentración capaz de inhibir el crecimiento del hongo (%H) en un 80% en comparación con el control de crecimiento.

$$\%H = \left[\frac{\text{Control} - (\text{Tratamiento} - \text{Blanco})}{\text{Control}} \right] * 100 \quad (3)$$

3. Análisis Estadístico

La valorización numérica de los espectrogramas obtenidos por IR se realizó mediante el uso del estadístico Origin.Lab y el programa Excel 16.0®. El análisis estadístico de las características físicas de los lotes de nanopartículas cargadas con extracto de planta se realizó mediante el software SPSS V 20®, con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$).

IV.3. Resultados y discusión

Elaboración nanopartículas poliméricas. El tamaño de las partículas es una de las características más importantes de los sistemas nanoportadores; en efecto, influye sobre liberación del fármaco, la biodistribución, la absorción celular y la estabilidad de las formulaciones (Armendaáriz-Barragán et al 2016; Rafiee et al 2019). En el presente estudio, las NP-Ext preparadas en diferentes lotes mostraron un tamaño de partícula medio en el rango de 90.257 ± 0.935 a 93.737 ± 1.285 nm, mientras que las NP sin extracto mostraron un tamaño de partículas de 53.6 ± 0.389 ; dicha diferencia en el tamaño evidencia la encapsulación del extracto.

Por otro lado, la homogeneidad en la distribución del tamaño y dispersión de las NP se evaluó con el valor del índice de polidispersibilidad (PDI). El PDI de las NP de Eudragit S100 cargadas con extracto de *E. tirucalli* osciló entre 0.125 ± 0.001 y 0.187 ± 0.006 , es decir, <0.2 , lo que indica una buena distribución de tamaño de las NP-Ext (Kesente et al. 2017).

Tabla.IV.1: Características físicas de las nanopartículas cargadas con extracto de *E. tirucalli*.

Lotes	Tamaño (nm)*	IPD*	Potencial Z (mV)*
L1	90.573 ± 1.075	0.187 ± 0.006	-7.797 ± 1.150
L2	91.4 ± 1.668	0.142 ± 0.021	-5.737 ± 0.349
L3	93.457 ± 0.654	0.137 ± 0.015	-5.74 ± 0.575
L4	93.737 ± 1.285	0.168 ± 0.005	-5.45 ± 0.435
L5	90.257 ± 0.935	0.125 ± 0.001	-5.513 ± 0.606
Promedio	91.885	0.152	-6.047
Dev	1.621	0.025	0.987
Blanco	53.6 ± 0.389	0.115 ± 0.009	-8.39 ± 0.491
n=5; * no hay diferencia significativa entre las variables ($p > 0.05$, $\alpha = 1$)			

Como otro parámetro importante en la caracterización de las NP, esta también el potencial zeta, ya que permite medir la carga superficial, así como informa sobre la estabilidad dispersión (Kesente et al. 2017; Roussaki et al. 2014). Como se puede apreciar en la Tabla IV.1, no se obtuvo diferencia significativa en cuanto a dicho parámetro en los 5 lotes de estudio. Se obtuvo valores de potencial Z negativos (-5.513 ± 0.606 a -7.797 ± 1.150 mV), lo que indica un estabilidad en suspensión, como para decir que no tiene tendencia en agregarse. Es importante mencionar que también se

obtuvo un valor negativo en potencial Z del blanco de las NP ($Z=-8.39\pm0.491$). De acuerdo con Biswaranjan et al. 2015 dicha carga se atribuye a los grupos de ácido acrílico libre de la Eudragit S100, como polímero aniónico. Sin embargo, en el cuadro de este estudio, se puede considerar que se obtuvieron un sistema matricial (nanoesfera) con una dispersión del principio activo dentro de la NP; dicha hipótesis se concretiza con los espectrogramas de las Blanco (NP no cargadas con el activo) y NP-Ext obtenidos en el FT-IR (Figura VI.2)

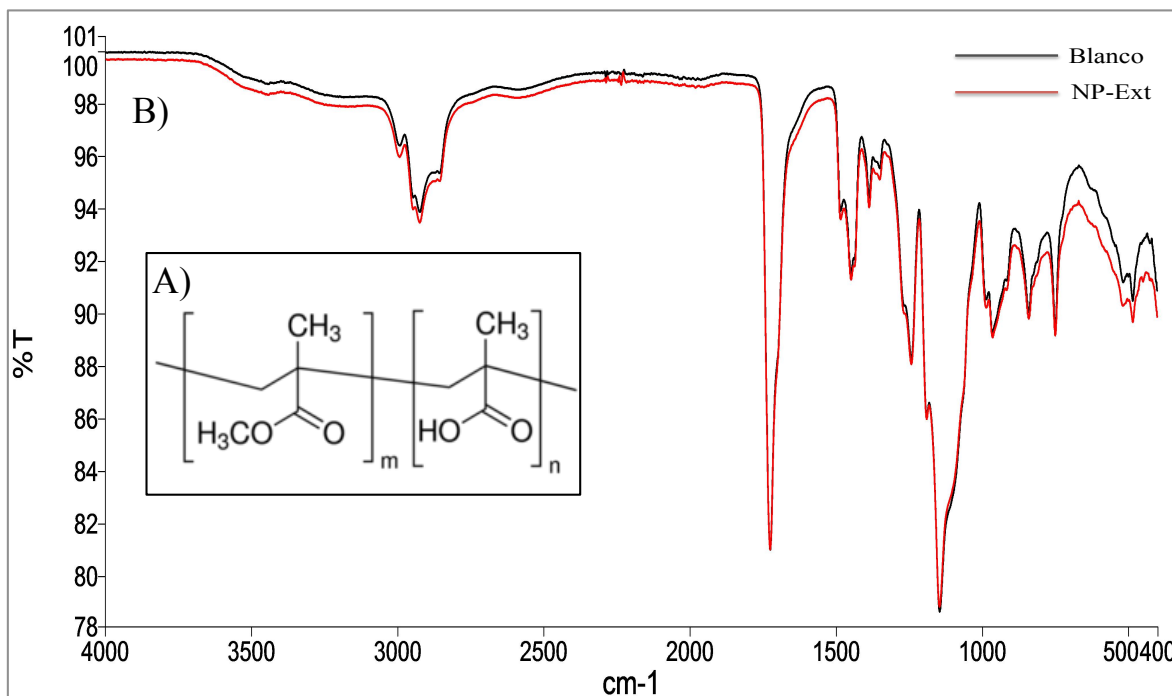


Figura IV.2. A) Estructura química de la Eudragit S100; B) Espectros de FT-IR de nanoesferas de NP-Ext, NP de Eudragit S100 (blanco).

Estadísticamente hablando, es importante mencionar que no se obtuvo diferencia significativa cuanto en el tamaño, IPD y potencial Z de los cinco lotes de NP-Ext obtenidas ($P>0.05$); lo que revela homogeneidad en las poblaciones de lotes de NP-Ext empleados, sino también la reproducibilidad en el método de síntesis de estos últimos.

1. Cuantificación de nanopartículas cargadas con particion de *E. tirucalli* (NP-Ext) por espectroscopía infrarroja.

Estudio de las condiciones del equipo. Los parámetros instrumentales, tales como la resolución nominal y el número de barridos adquiridos, son importantes para establecer

las mejores condiciones analíticas en el uso de la espectrometría infrarroja con fines cuantitativos, ya que influyen en la magnitud de las señales y el tiempo de análisis muestral (Robaina et al. 2013). Sin embargo, en este estudio, solo se empleó el número de barrido como variante analítica dado que el equipo tiene una resolución estándar de 4 cm^{-1} (Espectrómetro FT-IR FRONTIER, Perkin-Elmer, USA), y se analizó el comportamiento visual del espectro de IR ubicado entre $1640\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ($1665\text{-}1525\text{ cm}^{-1}$, como valor ajustado), correspondiendo al grupo amino (N-H).

Selectividad. En la primera etapa del desarrollo del método analítico se obtuvo la transmitancia total del extracto, de la Eudragit S100 y del tween 80 para identificar las señales de la espectroscopia mayoritariamente presente en el extracto y ausente en el polímero de encapsulación y el surfactante (Figura IV.2). Por lo que se seleccionó la banda de intensidad que se encuentra entre $1640\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ que se atribuye al estiramiento del grupo amino (N-H)

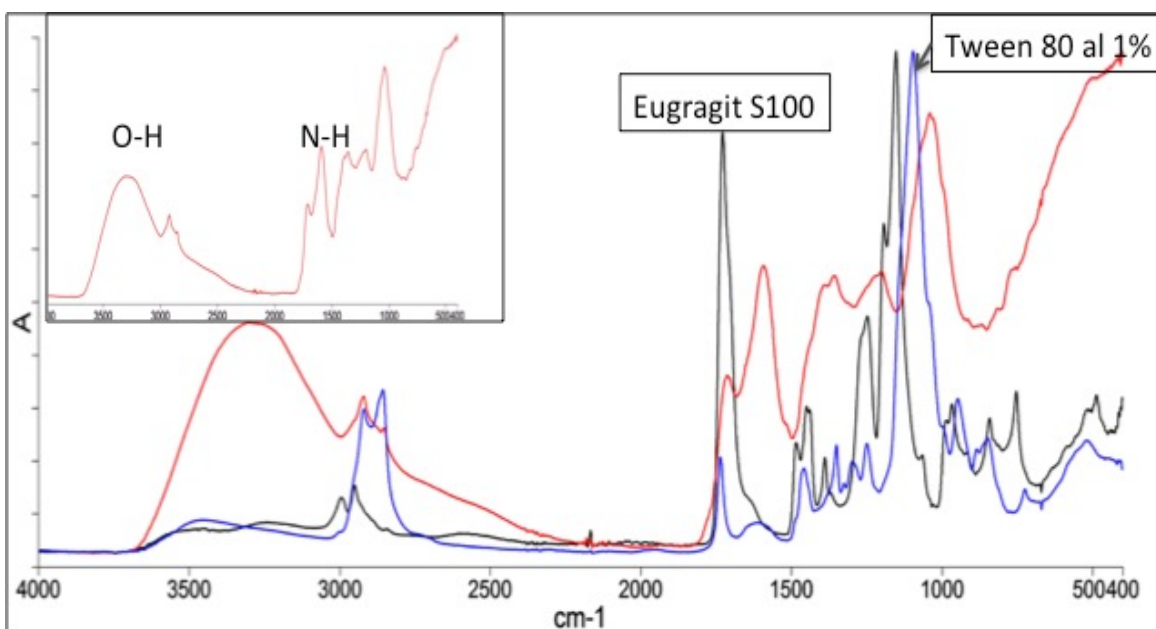


Figura IV.2.- Espectro infrarrojo comparativo del extracto, del tween 80 al 1% y de la eudragit S100.

Linealidad. Para determinar el rango de linealidad de absorbancia versus concentración del extracto de planta, se prepararon una serie de soluciones de distintas concentraciones extracto vegetal disuelto en metanol. Posteriormente, dichas soluciones fueron analizadas mediante espectroscopia de infrarrojo (Figura IV.2) y se determinó el rango de linealidad

del grupo amino en el rango de $1640\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$ ajustado a $1670\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$. La curva de absorbancia versus concentración se determinó mediante el cálculo del área de bajo de la curva y del punto más alto. Los resultados indicaron un rango de linealidad entre $100\text{--}3000\text{ }\mu\text{g/mL}$ con una R^2 de 0.98 para el área de bajo de la curva (Figura IV.3).

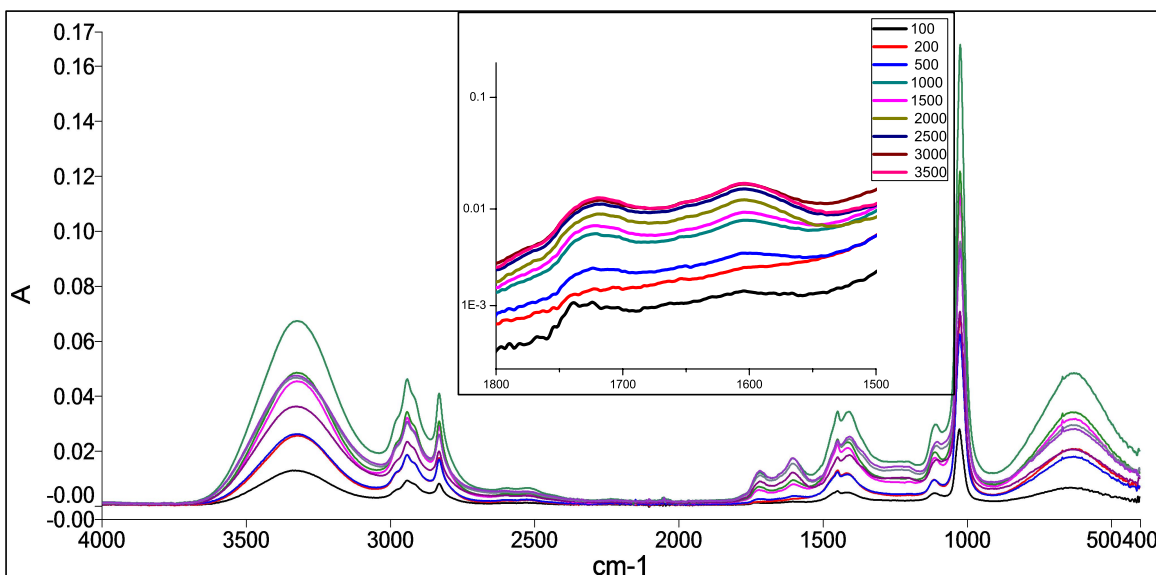


Figura IV.2.- Espectro de IR de soluciones con extracto a diferente concentración.

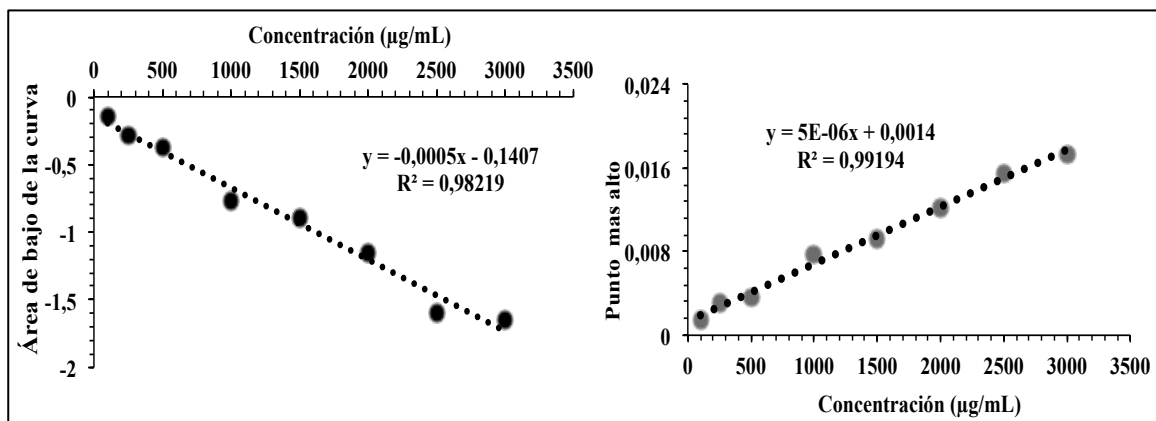


Figura IV.3.- Rango de linealidad de la concentración versus área de bajo de la curva.

Precisión y Exactitud. Para la precisión y exactitud, se realizó inicialmente el análisis IR de soluciones estándares del extracto de planta correspondiendo a los límites de la curva de calibración (100 , 1000 y $3000\text{ }\mu\text{g/mL}$) (Figura IV.3); después, se precedió el tratamiento de las pastillas de NP-Ext (extracción) y su análisis de IR respectivo, y finalmente se procedió a la valorización numérica de los espectros infrarrojos (Tabla 1).

Tabla IV.2. Valorización numérica de espectros infrarrojos para cuantificación de extracto formulados en NP.

Particiones	Método de medición	Banda	Intervalo de corrección	Linealidad ^a	R ²	RSD ^b (%)	LoD ^c (µg/mL)	LoQ ^d (µg/mL)
	Punto mas alto	1604	1670-1550	100-3000	0.99	3.973	1.07E-7	3.25E-7
Metanólica								
	Área de bajo la curva	1640-1560	1670-1550	100-3000	0.98	3.925	0.001	0.003

^a Rango de concentración (µg/mL) en el cual se obtuvo la R².

^b La RSD se obtuvo a partir de la del área de bajo de la curva y del punto mas alto de la concentración teórica del extracto formulado (1000 µg/mL).

^c Limite de Detección.

^d Limite de Quantificación.

$$LoD = 3.3 * \frac{\sigma}{b}$$

$$LoQ = 10 * \frac{\sigma}{b}$$

Nota: *b* es la pendiente

Se determinó la desviación estándar relativa para evaluar la respetabilidad (precisión) y reproducibilidad. Los resultados de RSD% indican la obtención de la curva de

calibración usando el área de bajo de la curva al igual que el punto más alto tienen buena respetabilidad y reproducibilidad, con valores de -3.92; dicho resultado es muy similar a los resultados obtenidos por Pandey; et al., 2007. También, se obtuvo 0.001 $\mu\text{g/mL}$ como límite de detección del extracto y 0.003 $\mu\text{g/mL}$ como límite de cuantificación. Estos resultados justifican que el presente método de cuantificación usando FT-IR es el adecuado y confiable para la cuantificación de extractos de *E. tirucalli* a partir de las nanoformulaciones.

Porcentaje de encapsulación. Dentro de los parámetros importantes en la determinación en la determinación del de la defectibilidad farmacológica de los nanoformulados, se encuentra la cantidad de fármaco presente en dicho nanoportador; En este trabajo, dicho parámetro se determinó mediante el método de FT-IR. En efecto, se emplearon 5 lotes de NP-Ext preparadas en la misma condición, en base a una concentración teórica de extracto igual a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados obtenidos se enumeran en la Tabla IV.2, utilizando el área de bajo de la curva de la banda característica considerada en 1604 cm^{-1} . Se obtuvieron eficacias de encapsulación que oscilan entre 42.93 y 46.93 %, Dicho valor es similar al reportado para otras formulaciones de NP biodegradables usando el mismo polímero con otros con extractos de planta y evaluados HPLC (Tanriberdi y Yapar 2017; El-Maghawry et al. 2020; Ramzy et al. 2020). Con respecto a porcentaje de encapsulación (%E), se obtuvieron valores bajos (entre 2.86 y 3.13%) , considerados bajos, dichos porcentajes podrían justificar el tamaño de las NP-Ext obtenidas. Aunque el metanol sea un compuesto altamente hidrofílico, debido a que se usaron extractos de planta como principios activos, es importante mencionar estos últimos suelen presentar dificultades en disolverse en su totalidad, lo que dificulta la incorporación en el sistema de NP (Nguyen et al. 2014). Los errores relativos porcentuales entre 53.7 y 57.07%; cabe mencionar que dicho error es relativo a la concentración de extracto en las NP, representando así la magnitud de la encapsulación (que tan cerca está la concentración del extracto encapsulado del valor teórico). De acuerdo con la farmacopea Brasileña (Anvisa 2019), el rango del error relativo porcentual debería de ser inferior al 10% en comprimido, sin embargo, en el cuadro de este estudio, se obtuvieron valores muy altas, lo que podría

estar relacionado a la dificultad en la encapsulación del activo en comparación con el sistema de comprimidos y otras formas de dosificación farmacéuticas.

Tabla IV 2. Resultados obtenidos para la determinación del porcentaje de encapsulación de extracto metanólico de *E. tirucalli* NP-Ext.

Modo de medición	Banda	Banda de corrección	Lote	CO ^a	CT ^b	Error (%) [*]	%EE ^{**}	%E ^{**}
Área de bajo la curva	1670-1620	1670-1550	1	431.3		56.87	21.57	2.88
			2	469.3		53.7	23.47	3.13
			3	429.3	1000	57.07	23.47	2.86
			4	436.3		56.37	21.82	2.91
			5	448.3		55.17	22.42	2.99

^a valor de la concentración de extracto encapsulado expresado en µg/mL.

^b Concentración teórica en µg/mL.

^{*} Error relativo porcentual entre el valor de absorción de la concentración teórica y el obtenido.

Error = $[(CT-CO)/CT]*100$ (CT: concentración teórica; CO: concentración observada).

2. Actividad antifúngica *in vitro* de extracto formulados en nanopartículas poliméricas de *E. tirucalli*.

Con el fin de comparar la actividad antidermatofítica de la partición cruda y formulada de *E. tirucalli*, se determinó también la CMI y la CMF de la partición metanólica encapsulada en nanopartículas poliméricas usando la Eudragit S100 como polímero de encapsulación. Se obtuvo una alta diferencia entre las CMI y las CMF de las NP-Ext y el extracto crudo; en efecto, se obtuvo una CMI de 55.55 µg/mL y de 0.1 µg/mL con las NP-Ext, mientras que estos mismos valores fueron de 125 µg/mL frente a *T. rubrum* y *T. interdigitalis* respectivamente (Tabla IV.3). Dicha mejoría de la actividad biológica podría estar relacionado con las propiedades fisicoquímicas encontradas de las NP-Ext. Como se observa en la tabla IV.1, el tamaño promedio de las NP-Ext oscila entre 90.257 ± 0.935 y 93.737 ± 1.285 nm; este pequeño tamaño proporciona a las NP-Ext le proporciona una mayor contacto con el microorganismo, donde la mejoría del potencial farmacológico con las NP-Ext en comparación con el extracto crudo (Roduner 2006). De acuerdo con Roduner et al. 2006, Las nanopartículas más pequeñas tienen una relación superficie-volumen más grande, por lo que el número de partículas por unidad de masa aumenta en comparación con las partículas más grandes. Lo que induce un cambio significativo en el comportamiento farmacológico; como para decir que una superficie de contacto más grande conduce a una mayor reactividad (Roduner 2006; Donaldson y Stone 2014).

También, se obtuvo que la carga superficial de las NP-Ext sintetizadas es negativa. Dicha carga, además de reflejar la estabilidad de las NP-Ext, permite una mayor atracción electrostática con la pared fúngica y los receptores dérmicos; dicha interacción podría constituir un punto crucial en la actividad antifúngica, dado que potencializa la absorción farmacéutica del extracto aumentando así su biodisponibilidad en el medio intracelular, lo que aumenta la toxicidad del activo (Roduner 2006; Zillich et al. 2015). En estudio similares, se ha comprobado que extractos de plantas formulados en NP poliméricas con carga negativa permitía la penetración de las NP cargadas con extractos de planta y liberación controlada en la piel. Otros estudios comprobaron que las NP cargadas negativamente potencializan la actividad farmacéutica de extractos de plantas sobre los microorganismos de afección dérmicas (Tamago et al. 2017; Krausz et al. 2017).

Tabla IV.3: Actividad antidermatofítica de la partición metanólica cruda y formulada de *E. tirucalli* frente a aislados clínicos de dermatofitos.

Cepa de dermatofito	Partición metanólica		NP-Ext		Clotrimazol	
	100%	80%	100%	80%	100%	80%
<i>Trichophyton rubrum</i>	500	125	250	55.55	0.4	0.1
<i>T. interdigitalis</i>	125	125	71.43	0.1	0.1	0.0004

n= 3. Resultados expresados en µg/mL.

Por otro lado, las NP-Ext obtenidas en el presente estudio, al ser de naturaleza coloidal con una dispersión del activo dentro de la matriz polimérica, además de tener una carga negativa, podrían tener mayor selectividad en sistemas biológicos y un destino más dirigido, lo que limitaría considerablemente los posibles efectos adversos del principio activo (partición) (Armendáriz-Barragán et al. 2016). De acuerdo con Feng et al., 2015, las NP de carga negativa tienen menor afinidad con la membrana plasmática de las células en comparación con las NP cargadas positivamente (Feng et al. 2015).

Como otro factor que podría justificar la mejoría de la NP-Ext sobre la partición cruda de *E. tirucalli* es la naturaleza del solvente empleado en la prueba biológica, lo que puede afectar considerablemente la hidratación e interacción de la forma de dosificación y del microorganismo. De acuerdo con Upadhyay et al. 2019, las formas de dosificación acuosas facilitan la absorción del fármaco en comparación a las otras formas de aplicación. Cabe mencionar que en el tratamiento actual de infecciones fúngicas superficiales se usa comúnmente fármacos insolubles en agua (anfotericinas, azoles y alilaminas), lo que reduce su penetración dérmica e interacción con el agente etiológico, lo que reduce su eficacia contra los hongos patógenos de la piel (Akhtar et al. 2013).

Conclusión

La banda de absorción del grupo amino del extracto (1640-1550) proporcionó suficiente sensibilidad y selectividad para la determinación del principio activo en las NP-Ext.

Donde dicho método se podría considerar como una excelente alternativa al método cromatográfico para el control de calidad de formulaciones farmacéuticas.

PERSPECTIVAS

En el presente estudio, se comprobó que las particiones metanólica y etanólica de *Euphobia tirucalli* tienen actividad antifúngica frente a aislados clínicos de dermatofitos, en específica *Tricophyton rubrum* y *T. mentahrophytes*. El encapsulado en nanoparticulas poliméricas de la partición metanólica de dicha planta muestro una mejoría en la capacidad farmacológica de dicho extracto, lo que dicha partición como posible tratamiento o coadyuvante para las dermatofitosis. Con respecto a las pruebas de toxicidad eritrocitaria, se obtuvo que dicha partición además de no ser toxica, es citoprotector, como para decir que podría apoyar el sistema natural de defensa del cuerpo, evitando así los efectos secundarios gracias a su efecto antioxidande. En efecto, hoy en día, se conoce la dificultad en el tratamiento de infecciones fúngicas debido a la dificultad de encontrar activos que presenta una toxicidad selectiva, ya que los hongos, al igual que el ser humanos, son eucariotas; sin embargo, las particiones etanólica y metanólica de *E. tirucalli*, presentaron una alta selectividad toxica. Debido a lo anterior, se propone llevar dicho estudios sobre líneas celulares más compleja para evidenciar con profundidad la selectividad toxica de dichas particiones, y llevar los estudios al nivel *in vivo* vía prueba tópicas con las particiones formuladas en nanoparticulas, para evidenciar la actividad terapéutica y el grado de absorción cutáneo de las nanoparticulas cargadas con dichos extractos.

BIBLIOGRAFÍA

- Joshi KB, Mandavia MK, Golakiya BA. 2018. Growth Inhibition and Induction of Apoptosis in Different Carcinoma Cell Lines by *Euphorbia tirucalli* Stem Extracts. 7(04):1439–47.
- Lorenzo-Cáceres JMS. 2016. *Euphorbia tirucalli*. 452(1753).
- Falasca SL. 2016. *Euphorbia tirucalli* L de especie ornamental a cultivo energético para zonas semiáridas de Argentina.
- Meccia G, Rojas J, Velasco J. 2008. Evaluation of antibacterial activity on different solvent extracts of *Euphorbia caracasana* Boiss and *Euphorbia cotinifolia* L . (Euphorbiaceae) collected in Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas Sociedad Latinoamericana.
- Mwine J, Damme P, Jumba F. 2010. Evaluation of larvicidal properties of the latex of *Euphorbia tirucalli* L. (Euphorbiaceae) against larvae of Anopheles mosquitoes. *J. Med. Plants Res.* **4**, 1954–1959.
- Prabha MN, Ramesh CK, Kuppast IJ. 2008. Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *euphorbia tirucalli* l . Latex. **6**, 1781–1787.
- Andrea A, Carmita J-J, Diana SM, Haydelba D. 2016. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador. 9:11–8.
- Arenas R. 2002. Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol.* 19:63-67.
- Pires CAA, da Cruz NFS, Lobato AM, de Sousa PO, Carneiro FRO, Mendes AMD. 2014. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. *An Bras Dermatol.* 89(2):259–64.
- Secretaría de Salud. 2008. Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y Tratamiento de Tiña y Onicomycosis en el Primer Nivel de Atención. 1-6.
- Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, Shaw D, Mushtaq K, Paul RA. 2018. Mutation in the squalene epoxidase gene of trichophyton interdigitale and trichophyton rubrum associated with allylamine resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(5):1–9.
- Ghannoum M. 2016. Azole resistance in dermatophytes: Prevalence and mechanism of action. *J Am Podiatr Med Assoc.* 106(1):79–86.
- Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. 2008. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia.* 166(5–6):369–83.
- Heinrich M, Gibbons S. 2017. Ethnopharmacology in drug discovery : An analysis of its role and potential contribution Ethnopharmacology in drug discovery : an analysis of its role and potential contribution.
- Yesilada E. 2005. Past and future contributions to traditional medicine in the health care system of the Middle-East. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 135–137.
- Joshi KB, Mandavia MK, Golakiya BA. 2018. Growth Inhibition and Induction of Apoptosis in Different Carcinoma Cell Lines by *Euphorbia tirucalli* Stem Extracts. **7**, 1439–1447.
- Rafiee Z, Nejatian M, Daeihamed M, Jafari SM. 2019. Application of curcumin-loaded nanocarriers for food, drug and cosmetic purposes. *Trends Food Sci. Technol.* **88**, 445–458.
- Butler MS. Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics [cited 2015 Nov

5]. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295205006635>

- Sánchez-Saldaña L, Matos-Sánchez RHKS. 2009. Infecciones micóticas superficiales Superficial fungal infections. *Dermatología Peru*.19(3):226-266.
- Isabel S, Am E, Bernardino F. 1841. Dermatofitosis.
- Pérez JE, Cárdenas C, Hoyos AM. 2011. Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de la onicomicosis en un laboratorio de referencia, Manizales (Caldas), 2009. *Infectio*. 15(576):168-176. doi:10.1016/S0123-9392(11)70081-9
- Bonifaz A, Badali H, de Hoog GS. 2008. Tinea nigra by Hortaea werneckii, a report of 22 cases from Mexico. *Stud Mycol*. 2008;61:77-82. doi:10.3114/sim.2008.61.07
- Puig L, Rull E. 2011. Tiña interdigital de los pies (pie de atleta): su diagnóstico y últimos avances en su tratamiento.
- Pratt H. Epidemiology and control of vector-borne diseases. 1964:10.
- Sarah Kidd, Catriona Halliday, Helealexio D. 2016 *Descriptions of Medical Fungi*.
- Jorgensen JH. *Manual of Clinical Microbiology*.
- Bonifaz A. 2015. Micosis y pseudomicosis. 2015.
- Cadavid M, Restrepo BN, Cardona N. 2013. Estudio etiológico y epidemiológico de las micosis cutáneas en un laboratorio de referencia – Antioquia – Colombia. *Rev CES Med*. 27(1):7-19.
- Diego PZ, Calvo AMG, Lafuente EE, Familiar M. manifestaciones cutáneas de la diabetes. :36-42.
- Garza-garza R, Ocampo-candiani SEGJ. 2014. Manifestaciones cutáneas del VIH. 1:5-8.
- Jiménez-Olvera HD, Briseño-Gascón G, Vásquez-del Mercado E, Arenas R. 2017. Tinea pedis.15(3):156-161.
- Mariana M, Refojo N, Davel G. 2018. Epidemiology of dermatophytoses in 31 municipalities of the province of Buenos Aires, Argentina: A 6-year study. *Rev Iberoam Micol*. 35(2):97-102. doi:10.1016/j.riam.2017.07.002
- Arenas R, Moreno G. 2010. Micosis superficiales en pacientes que viven con VIH/sIDA. Revisión 2010 del Consenso Nacional de Micosis superficiales. 2010.
- Isabel S, Am E, Bernardino F.1841. Dermatofitosis.
- Mayorga J, Prado-trillo A. 2016. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes con infección por *Microsporum canis*. 18–23.
- Pires CAA, Lobato AM, Carneiro FRO, Santos da Cruz NF, Oliveira de Sousa P, Mendes AMD. 2014. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. *An. Bras. Dermatol*. 89, 259–264.
- Manzano-gayosso P. 2008. su relevancia médica y socioeconómica. 144, 123–124 .
- Ghannoum M. 2016. Azole resistance in dermatophytes: Prevalence and mechanism of action. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc*. 106, 79–86.
- Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. 2008. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia* 166, 369–383.
- Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, Shaw D, Mushtaq K, Paul RA, Narang T, Chakrabarti A. 2018. Mutation in the squalene epoxidase gene of trichophyton interdigitale and trichophyton rubrum associated with allylamine resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*. 62, 1–9.
- Amer H, Atia A, Tawil K. 2017. Bacterial Contamination of Computer Keyboards and Mice in University and Hospital Settings. *DJ Int. J. Med. Res*. 2, 1–7.

- De Boer E, Heuvelink AE. 2000. Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 88.
- Musser AW, Beamer PR. 1961. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Indiana State Med. Assoc.* 54, 1627–1634.
- Davicino R, Matta MA, Casali YA, Correa SG, Pattenati EM, Macalizza B. 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Rev. Peru. Biol.* 14, 247–251.
- Dabur R, Singh H, Chhillar AK, Ali M, Sharma GL. 2004. Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 75, 389–391.
- Fenner R, Sortino M, Kuze Rates SM, Dall Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nör C, Von Poser G, Schapoval E, Zacchino S. 2005. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine* 12, 236–240.
- García-Hernández DG, Rivas-Morales C, Leos-Rivas C. 2016. Actividad antifúngica. *Investig. en plantas importancia médica* 101–128 doi:10.3926/oms.314.
- Sule A, Ahmed QU, Lapit J, Samah OA, Omar MN, Umar A, S Dogarai B. 2012. Antifungal activity of *Andrographis paniculata* extracts and active principles against skin pathogenic fungal strains *in vitro*. *Pharm. Biol.* 50, 850–856.
- Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 88, 199–204.
- Lorenzo-Cáceres JMS. 2016. *Euphorbia tirucalli*. 452.
- Falasca SL. 2016. *Euphorbia tirucalli* L de especie ornamental a cultivo energético para zonas semiáridas de Argentina.
- Amri E. 2016. Antifungal Activity and Phytochemical Screening of Different Solvent Extracts Antifungal Activity and Phytochemical Screening of Different Solvent Extracts of *Euphorbia tirucalli*. doi:10.9734/JABB/2016/26727.
- Gupta N, Vishnoi G, Wal A, Wal P. 2013. Medicinal Value of *Euphorbia Tirucalli*. 4.
- Melo GEM, Méndez GL, Fortich MDRO. 2015. Actividad antibacteriana *in vitro* de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné. *Rev. Cuba. Farm.* 49, 103–116.
- Clinical for Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard- second edition. Document M38-A2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008.
- Rivas Morales C, Salinas Carmona M, Galán Wong L, Medrano Roldán H. 2007. Operación unitaria para la propagación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 para la producción de proteasas con potencial biotecnológico.
- Barrow G, Feltham R. 2003. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Journal of clinical pathology* vol. 46.
- Alia C. 2009. Diagnóstico microbiológico. *Identificación y antibiograma* 36.
- CLSI. 1999 M26-A Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline This document provides procedures for determining the lethal activity of antimicrobial agents.
- Verde-star MJ, García-González S, Rivas-Morales C. 2016. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. pp.1-40
- World Health Organization (WHO). 1999. Health impacts of health-care waste. *Safe*

Manag. wastes from Heal. Act. 20–30.

- Broumand C. Minimizing Transmission of Infectious Disease in Health Care Environments by Use of Disinfectable PC Keyboards and Mice.
- Mahomoodally MF, Gurib-Fakim A, Subratty AH. 2005. Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. *Pharm. Biol.* 43, 237–242.
- Veloza Cely WF, Javier A, Matulevich, WFC. 2014. Triterpenos y esteroides de salvia leucantha (lamiaceae) y evaluación. 68–79.
- Racero JC, Collado GI, Macías JA. 2004. Síntesis de sesquiterpenos isocariolánicos con potencial actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea*. 8, 58–66.
- Enrique L, Suárez C, Andrés C, Barrera C, Coy ED. 2011. Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas Antibacterial activity of terpenes and alkaloids isolated from three Colombian plants. 45, 275–282.
- Bueno J, Stashenko E. 2009. Artículos Originales Actividad antimicobacteriana de terpenos.
- Cristian N, Zarate SG, Consuelo L. 2017. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Antimicrobial activity of four varieties of plants against pathogens clinical. *Nova* 15, 119–129
- Pandey AK. 2007. Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Parthenium hysterophorus*: An in vitro study. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 30, 383–386.
- Miron D, Battisti F, Silva FK, Lana DA, Pippi B, Casanova B, Gnoatto S, Fuentesfria A, Mayorga P, Schapoval E. 2014. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Brazilian J. Pharmacogn.* 24, 660–667.
- Khan AQ, Rasheed T, Kazmi NUH, Ahmed Z, Malik A. 1988. Cycloeuphordenol, a new Triterpene From *Euphorbia*. *Phytochemistry*. 27, 2279–2281.
- Rasool N, Khan QA, Malik A. 1989. A taraxerane type triterpene from *Euphorbia tirucalli*. *Phytochemistry*. 28, 1193–1195.
- Duong TH, Beniddir MA, Genta-Jouve G, Nguyen H-H, Nguyen D-P, Nguyen T-A-T, Mac D-H, Boustie J, Nguyen K-P-P, Chavasiri W, Pogam LP. 2019. Further terpenoids from *Euphorbia tirucalli*. *Fitoterapia* 135, 44–51.
- Prasad SHKR. 2011. efficacy of *Euphorbia tirucalli* (L.) towards microbicidal activity against human pathogens. *Int. J. Pharma Bio Sci. Res.* 229–235.
- Ruiz Á, Rodríguez C. 2018. Estudio *in vitro* de la Actividad Antifúngica de un Nuevo Extracto Natural In vitro Study of the Antifungal Activity from a New Natural Extract. 399–402.
- S Aisah, Genatrika E, Utami PI. 2017. The Effectiveness of Ointment of Patah Tulang Stem ' s (*Euphorbia Tirucalli*) Ethanol Extract for Burn Wound Healing on White Rats (*Rattus Norvegicus*) The Effectiveness of Ointment of Patah Tulang Stem ' s (*Euphorbia Tirucalli*) Ethanol Extract for Bu. doi:10.1088/1757-899X/288/1/012055.
- Culebras JM, Tuñón M.J. 2002. Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. 271–278.
- Goutam M, Sadhan KR, Jnanojjal C. 2017. *Euphorbia tirucalli* L .: a review on its potential pharmacological. *International journal of scientific research*. 241–245.

- Rhodes LE. 1998. Topical and systemic approaches for protection against solar radiation- induced skin damage. *Dermatol Clin.* 16: 75–82.
- Baliga MS, Katiyar KS. 2006 Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochemistry and Photobiological Sciences.* (5): 243-253.
- Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I. 2013. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences.* 12: 54-64.
- Koh HK, Geller AC, Miller DR, Grossbart TA, Lew RA. 1996. Prevention and early detection strategies for melanoma and skin cancer. *Arch Dermatol.* 132(4): 436-43.
- Wikonkai NM, Brash DE. 1999. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 4(1): 6-10.
- Yaar M, Gilchrest BA. 1998. Aging and photoaging: postulated mechanisms and effectors. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 3: 47-51.
- Nishigori C, Yarosh DB, Donawho C, Kripke ML. 1996. The immune system in ultraviolet carcinogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1(2): 143-6.
- Sliney DH. 1994. Epidemiological studies of sunlight and cataract: the critical factor of ultraviolet exposure geometry. *Ophthalmic Epidemiol.* 2(1): 107-119.
- Stevanato R, Bertelle M, Fabris S. 2014. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regul Toxicol Pharmacol.* doi: 10.1016/j.yrtph.2014.02.014
- SAX BW. 2000 Educating Consumers about sun protection. *Pharm. Times, New York.* 66(5):48-50.
- Alvarez-suarez JM, Giampieri F, González-Paramás AM, Damiani E, Astolfi P, Martinez-Sanchez G, Bompadref S, Quiles JL, Santos-Buelga C, Battino M. 2012. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. doi: 10.1016/j.fct.2012.01.042.
- Reuter J, Merfort I, Schempp CM. 2010. Botanicals in dermatology: an evidence-based review. *Am J Clin Dermatol.* 11(4): 247–267
- Leos-Rivas C, Rivas-Morales C, García-Hernández D. 2016. Actividad antioxidante y toxicidad. *Investigación en plantas de importancia médica.* Barcelona, España: OmniaScience. 41-76.
- Botta A, Martínez A, Balboa V, Conde E, Vinardell E, Pilar M. 2014. Toxicology in vitro erythrocytes and cell line-based assays to evaluate the cytoprotective activity of antioxidant components obtained from natural sources'. *toxicology in vitro.* doi: 10.1016/j.tiv.2013.10.004.
- Yi Qs, Wan Zarina Za, Nurulhidayah CN, Mohamad Ezany y, Azlina, ASM. 2017. The Antibacterial Properties of *Euphorbia tirucalli* stem extracts against dental caries-related bacteria. 12(1): 34–41.
- Gupta N, Vishnoi G, Wal A, Wal P. 2013. Medicinal Value of *Euphorbia Tirucalli*. *Systematic reviews in pharmacy.* 4(1). doi: 10.4103/0975-8453.135843.
- Upadhyay B, Singh KP, Kumar A. 2010. Ethno-medicinal, Phytochemical and Antimicrobial studies of *Euphorbia tirucalli* L. *Journal of Phytology* (2): 65-77.
- Aisah S, Utami PI, Genatrika E. 2018. The effectiveness of ointment of patah tulang stem's (*Euphorbia tirucalli*) ethanol extract for burn wound healing on white rats (*Rattus norvegicus*). *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering.* doi: 10.1088/1757-899X/288/1/012055.

- Mansur J, Breder M, Mansur M, Azulay R. 1986. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 61 (1): 121-124
- Sayre R, Desrochers D, Marlow E. 1980. Sunscreen testing methods: *in vitro* predictions of Effectiveness. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 31 (1): 133-43
- Shahidi F, Naczsk M. 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications. Technomic Publishing Inc. Lancaste. 287-293
- Cyboran S, Oszmiański J, Kleszczyńska H. 2012. Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane. *Cell Mol Biol Lett.* 2012. doi: 10.2478/s11658-011-0038-4
- William TT, Lux SE. 2005. Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1999.01130.x>
- Gupta M. 1995. 270 plantas Medicinales Iberoamericanas. (Colombia: Convenio Andres Bello, CYTED). 413-418..
- Azzeme A, Adibah M, Zaman K. 2019. Plant toxins: alkaloids and their toxicities. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences.* doi: 10.30574/gscbps.2019.6.2.0003.
- McLaughlin JL, Lingling LR, Anderson JE. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information J.* (32): 513-524.
- Chaudhuri S, Anwesh B, Kaushik B, Bidisa S, Pradeep KS. 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *Int J Biol Macromol.* doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.12.003.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras M, Tuñón J. 2002 . Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 1(6): 271–278.
- Zhang J, Xiang H, Hussain Ahmad, Hao Zhang, Lili Zhang, Tian Wang. 2014. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chemistry.* doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.025.
- Amores CC, José P, Benavides H. 2018. Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos anti envejecimiento Antioxidant actives in the formulation of antiaging cosmetic products. *Ars Pharm.* 59(2): 77–84.
- Chen L, Hu JY, Wang SQ. 2012. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *J Am Acad Dermatol.* 67(5): 1013–1024.
- Ramos C, Ivonne G. 2011. Antioxidantes en dermatología Antioxidants in Dermatology. *Dermatología CMQ.* 8(4), pp. 272–277.
- Goutam M, Sadhan Kumar RJC. 2017. *Euphorbia tirucalli* l a review on its potential pharmacological use in chronic diseases. *International Journal of Scientific Research.* (8).
- Garza-garza R, Ocampo-candiani SEGJ. 2014. Manifestaciones cutáneas del VIH. 5–8.
- Bonifaz A. 2016. Extensa dermatofitosis de piel y uñas en un paciente con VIH-SIDA. **60**, 558–561.
- Arenas R, Moreno G. 2010. Micosis superficiales en pacientes que viven con VIH/sida. Revisión 2010 del Consenso Nacional de Micosis superficiales.
- Bonifaz A. 2015. Micosis y seudomicosis.
- Bonifaz A, Gómez-Daza F, Paradez V, Ponce RM. 2008. Tinea nigra by *Hortaea werneckii*, a report of 22 cases from Mexico. *Stud. Mycol.* **61**, 77–82.
- Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. 2009. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide (*Mycoses* (2008) 51, SUPPL. 4, (2-15)). *Mycoses* **52**, 95.

- Watanabe S. 2008. Dermatomycosis--classification, etiology, pathogenesis, and treatment. *Nihon Rinsho*. **66**, 2285–2289.
- Yesilada E. 2005. Past and future contributions to traditional medicine in the health care system of the Middle-East. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 135–137 (2005).
- Andrea A, Carmita J-J, Diana SM, Haydelba D. 2016. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador. **9**, 11–18.
- Cristian N, Zarate GS, Consuelo L. 2017. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Antimicrobial activity of four varieties of plants against pathogens clinical. *Nova* **15**, 119–129.
- Pérez-Narváez OA, Leos-Rivas C, Rivas-Morales C, Villarreal-Treviño L, Barrón-González MP, Sánchez-García E. 2019. Actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos etanólicos de oja de *Arbutus xalapensis* Kunt, *Mimosa malacophylla* Gray y *Teucrium cubense* Jacquin. *Rev. Tendencias en Docencia e Investig. en Química* **5**, 739–747.
- Prabha MN, Ramesh CK, Kuppast IJ. 2008. Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *euphorbia tirucalli* L. *Latex*. **6**, 1781–1787.
- Hamishehkar H, Rahimpour Y, Kouhsoltani M. 2013. Niosomes as a propitious carrier for topical drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 261–272.
- Kaur IP, Kakkar S. 2010. Topical delivery of antifungal agents. *Expert Opin. Drug Deliv.* **7**, 1303–1327.
- Armendáriz-Barragán B, Zafar N, Badri W, Galindo-Rodríguez SA, Kabbaj D, Fessi H, Alaissari A. 2016. Expert Opinion on Drug Delivery Plant extracts: from encapsulation to application. *Expert Opin. Drug Deliv.* **13**, 1165–1175.
- Clinical for Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard- second edition. Document M38-A2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008).
- Rafiee Z, Nejatian M, Daeihamed M, Jafari SM. 2019. Application of curcumin-loaded nanocarriers for food, drug and cosmetic purposes. *Trends Food Sci. Technol.* **88**, 445–458.
- Kesente M, Kavetsou E, Roussaki M, Blidi S, Loupassaka S, Chanioti S, Siamandoura P, Stamatogianni C, Philippou E, Papaspyrides C, Vouyiouka S, Detsi A. 2017. Encapsulation of Olive Leaves Extracts in Biodegradable PLA Nanoparticles for Use in Cosmetic Formulation. *Bioengineering* **4**, 75.
- Roussaki M, Gaitanarou A, Diamanti PCh Vouyiouka S, Papaspyrides C, Kefalas P, Detsi A. 2014. Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles. *Polym. Degrad. Stab.* **108**, 182–187.
- Subudhi MB, Jain A, Jain A, Hurkat P, Shilpi S, Gulbake A, Jain SK. 2015. Eudragit S100 coated citrus pectin nanoparticles for colon targeting of 5-fluorouracil. *Materials (Basel)*. **8**, 832–849.
- Robaina NF, de Paula CER, Brum DM, de la Guardia M, Garrigues S, Cassella RJ. 2013. Novel approach for the determination of azithromycin in pharmaceutical formulations by Fourier transform infrared spectroscopy in film-through transmission mode. *Microchem. J.* **110**, 301–307.
- Pandey AK. 2007. Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and

- obnoxious weed *Parthenium hysterophorus*: An in vitro study. *Natl. Acad. Sci. Lett.* **30**, 383–386.
- Tanriverdi ST, Yapar EA. 2017. Preparation and characterization of herbal emulsion formulations. *Marmara Pharm. J.* **21**, 756–761.
- El-Maghawry E, Tadros MI, Elkheshen SA, Abd-Elbary A. 2020. Eudragit®-s100 coated plga nanoparticles for colon targeting of etoricoxib: Optimization and pharmacokinetic assessments in healthy human volunteers. *Int. J. Nanomedicine* **15**, 3965–3980.
- Ramzy L, Metwally AA, Nasr M, Awad GAS. 2020. Novel thymoquinone lipidic core nanocapsules with anisamide-polymethacrylate shell for colon cancer cells overexpressing sigma receptors. *Sci. Rep.* **10**, 1–15.
- Nguyen ATB, Winckler P, Loison P, Wache Y, Chambin O. 2014. Physico-chemical state influences in vitro release profile of curcumin from pectin beads. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **121**, 290–298.
- ANVISA. 2019. *Brazilian Pharmacopoeia. Brazilian Pharmacopoeia 6th Edition* vol. 1.
- Roduner E. 2006. Size matters: Why nanomaterials are different. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 583–592.
- Donaldson K, Stone V. 2014. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Handb. Clin. Neurol.* **125**, 477–497.
- Zillich OV, Eisner P, Kerscher M. 2015. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int. J. Cosmet. Sci.* **37**, 455–464.
- Tamargo B, Monzole L, Piñon A, Machin L, García M, Scull R, Setzer WN. 2017. In Vitro and In Vivo Evaluation of Essential Oil from *Artemisia absinthium* L. Formulated in Nanocochleates against Cutaneous Leishmaniasis. *Medicines* **4**, 38.
- Krausz AE, Adler BL, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine R, Chandra D, Liang H, Gunther L, Clendaniel A, Harper S, Friedman JM, Nosanchuk JD, Friedman AJ. 2015. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **11**, 195–206.
- Feng ZV, Gunsolus IL, Qiu TA, Hurley KR, Nyberg LH, Frew, Hilena Johnson KP, Vartanian AM, Jacob LM, Lohse SE, Torelli M. 2015. Impacts of gold nanoparticle charge and ligand type on surface binding and toxicity to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Chem. Sci.* **6**, 5186–5196.
- Upadhyay P, Kaur M, Choudhary A, Shaina Kumar DNBG. 2019. Transungal Drug Delivery System: A Review. **57**, 50–56.
- Akhtar MS, Panwar J, Yun YS. 2013. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **1**, 591–602.

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Heya Michel Stéphane

Candidato al Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Biotecnología

Tesis: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE EXTRACTOS CRUDOS Y FORMULADOS DE *Euphorbia tirucalli*.

Campos de estudios: Micología; Fitoquímica; Química de productos naturales; Nanotecnología.

Datos Personales: Nacido el 17 de septiembre de 1992, en Nkondjock, Cameroun.

Educación: Doctorado en Ciencias con Orientación en Biotecnología en la Facultad de Ciencias Biológicas (Instituto de Biotecnología), U.A.N.L | 2016-2021

Licenciatura en Bioinformática-Bioestadística (revalidada como **Ingeniería en Biotecnología**, en la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L) en la Facultad de Ciencias biológicas, Universidad de Douala-Cameroun | 2011- 2015

Experiencia Profesional: Investigación en el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas | 2016-2021.

Artículos

Artículo aceptado en la **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas** el trabajo titulado: Actividad citoprotectora y fotoprotectora de extractos de *Euphorbia tirucalli*.

Artículo aceptado en **Dermatología Revista Mexicana** el trabajo titulado: Diagnóstico de la *tinea pedis* y *tinea unguium* en la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México.

Artículo en revisión en la revista **Helyion**: Actividad antibiótica *in vitro* de particiones de *Euphorbia tirucalli* L. sobre microorganismos de importancia clínica.

Review

Trabajo de revisión publicado en **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**: Nano-biomaterials in-focus as sensing/detection cues for environmental pollutants. **(Co-autor)**

Congresos

Presentación en la sesión de CARTEL en el XII Congreso Nacional de Micología el trabajo de investigación “Estudio epidemiológico sobre dermatofitosis en la zona metropolitana de Monterrey” | 2018

Presentación por ponencia del trabajo de investigación: Perfil fitoquímico, actividad toxica sobre *Artemia salina* y eritrocitos humanos y actividad citoprotectora de extractos obtenidos de *Euphorbia tirucalli* | 2019

Presentación en la sesión de CARTEL del trabajo intitulado “Actividad citoprotectora y fotoprotectora de extractos de *Euphorbia tirucalli* en el 5to Taller académico. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L, N.L | 22/10/2019



Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C.
Nicolás San Juan 1511
Del Valle, C. P. 03100
Benito Juárez, Ciudad de México, México
+52 (55) 9183 2060
rmcf.afmac.org.mx

Expediente: 751

Ciudad de México a 21 de abril de 2020

Dr. David Gilberto García Hernández
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Autónoma de Nuevo León

P r e s e n t e

Estimado doctor García Hernández:

Le comunico que el artículo intitulado:

“Actividad citoprotectora y fotoprotectora de extractos de *Euphorbia tirucalli*”

de los autores *Michel Stéphane Heya, Sergio Arturo Galindo Rodríguez, Verde Star María Julia, Catalina Rivas Morales, García Hernández David Gilberto*, ha sido ACEPTADO CON MODIFICACIONES MENORES, para su publicación en la Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas (RMCF).

Adjunto encontrará las observaciones y comentarios producto de la evaluación. Le pido tenga a bien revisarlas y realice las modificaciones pertinentes. Asimismo, se anexan las Instrucciones al Autor vigentes, le pedimos ajuste su documento a los nuevos requerimientos.

Le solicito envíe la versión modificada marcando en 2 colores distintos las correcciones de acuerdo a los evaluadores, en un período no mayor de 15 días a las instalaciones de AFMAC o bien por vía electrónica (rmcf@afmac.org.mx). Si requiere más tiempo para contestar las observaciones le pedimos lo solicite por escrito y antes del vencimiento de este término. Así mismo, se le solicita adjunte carta firmada por el autor responsable, en donde se indiquen claramente las modificaciones efectuadas, y en caso de no coincidir con alguna observación de los revisores, argumente al respecto.

En espera de su pronta respuesta, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Por la superación Técnica y Científica

Dra. Inés Fuentes Noriega

co-Editora

Dr. Robledo:

Su artículo Diagnóstico de la tinea pedis y tinea unguium en la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México, fue aceptado para publicación en Dermatología Revista Mexicana, tentativamente en el número 5-21.

Saludos

Lic. Evangelina Andraca Alcalá

Coordinación editorial



Contents lists available at ScienceDirect

Case Studies in Chemical and Environmental Engineering

journal homepage: www.editorialmanager.com/cscee/default.aspx

Nano-biomaterials in-focus as sensing/detection cues for environmental pollutants

K.M. Aguilar-Pérez^a, M.S. Heya^b, Roberto Parra-Saldívar^c, Hafiz M.N. Iqbal^{c,*}^a Tecnológico de Monterrey, School of Engineering and Sciences, Atizapán de Zaragoza, Estado de México, 52926, México^b Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza, N.L., México^c Tecnológico de Monterrey, School of Engineering and Sciences, Monterrey, 64849, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Nano-biomaterials
 Nano-biosensors
 Heavy metals
 Green chemistry
 Green functionalization
 Detection limits

ABSTRACT

Direct detection of pollutants, such as heavy metals, pesticides, and toxins from waste streams and monitoring of water and soil conditions, are significant challenges in the field of environmental and analytical chemistry. The current techniques implemented for real-time analysis and monitoring of contaminated specimens have been limited due to the lack of tools with broad detection limits and the necessity of expensive laboratory equipment. In this regard, efforts in developing sensing technologies have been put forward during the last years by various research groups. Moreover, cost-effective, compact, and eco-friendly sensors are required. Nanotechnology provides leading biosensors using novel nanofabrication and green synthesis techniques. Nano biosensors utilized for the detection of pollutants exhibit ultra-sensitivity and quick detection time in real-time analysis. Additionally, detection limits at the nanomolar to picomolar level for pollutants have already been reported in the literature. Herein, we summarize nanotechnological advances in green chemical sensors for environmental proposes, focusing on the detection of contaminants in soil and water.

1. Introduction

In recent years, water and agricultural soils have deteriorated due to the contamination generated by compounds of anthropogenic origin [1]. For these reasons, the use of nanomaterials (e.g., metallic nanoparticles, polymers, nanocomposites, carbon nanotubes, etc.) has demonstrated benefits, such as fast, *in situ*, and real-time environmental diagnosis, detection, monitoring, and treatment of wastewater matrices [2]. Nanomaterials possess average size in the range of 1–100 nm in at least one dimension and are characterized for their unique structures and properties (e.g., mechanical, optical, and electrical) given their large surface area to volume ratio [3]. The use of bio-elements coupled with the green functionalization of nanomaterials allows the fabrication of nano-bio-sensors for environmental monitoring. The remarkable characteristics of nano-bio-sensors compared to the traditional methodologies make them highly sensitive and cost-effective instruments for environmental tracking and pollutant detection. They are broadly classified into two categories, i.e., bio-receptor and transducers. Bio-receptor based biosensors are further categorized as enzyme, protein, antibody, bacteria, and DNA based. Based on the transduction methods, biosensors are categorized into three types, i.e., electrochemical, optical,

calorimetric and mass-based biosensors [4]. Nevertheless, a better understanding of the properties of nanomaterials and the advantages and limitations of the current nano-biosensing technologies (Table 1) may represent a progress in the design of safer products for human health and environment.

2. Green synthesis of nano-bio-materials

Nanomaterials can be synthesized by diverse chemical, physical, biological, and hybrid techniques. However, through biological methods, manufacturing processes facilitate the use of plant extracts, microorganisms (e.g., bacteria and fungi), algae, enzymes, biomolecules, and industrial or agricultural wastes. Additionally, green methods for on-site diagnosis of heavy metals became one of the leading solutions proposed in recent years due to its advantages compared to other environmentally benign processes; the benefits include ease of availability, non-toxicity, rapid synthesis, and easy recovery. The combination of nanomaterials properties with biomolecules results in a synergistic effect that has aided to achieve competent nano-bio-sensors. Hence, a variety of nano-biosensors for environmental and quality-controlled applications has been reported as a potential strategy for the detection of plant infections,

* Corresponding author.

E-mail address: hafiz.iqbal@tec.mx (H.M.N. Iqbal).<https://doi.org/10.1016/j.cscee.2020.100055>

Received 26 September 2020; Received in revised form 4 November 2020; Accepted 7 November 2020

2666-0164/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Table 1
Advantages and disadvantages of the use of nanobiosensors for detection of environmental pollutants.

Advantages	Disadvantages
✓ Environmental diagnosis	× Chemical factors may compromise the stability under extreme conditions
✓ Highly specific and sensitive detection	× Lack of methods to increase their reusability
✓ Small size	× Strategies for scalability is still not clear
✓ Cost-effectiveness	× Limited detection and quantification of transformation products
✓ Easy portability	× Inefficiency against multiple contaminants
✓ Eco-friendly fabrication methods	
✓ Simultaneous detection of pollutants	

pesticides in soil, or the presence of heavy metals in water, providing rapid analysis, high sensitivity, and accuracy [5,6]. Fig. 1 shows the synergy of nanotechnology and green chemistry for the development of nano-bio-sensors to detect pollutants in soil and water.

2.1. Synthesis of nano-bio-materials using plants

Alkaloids, proteins, carbohydrates, and phenolic compounds are the most common secondary metabolites used for environmental diagnosis. It is noteworthy that the synthesis of nano-bio-materials based on these metabolites consists of a mixture of a metallic precursor (i.e., gold (Au) and silver (Ag)) with some plant extract; the formation of nanoparticles is revealed by the change in coloration of the solution due to the nucleation process of the metallic atoms (change of the oxidation state into a zero valence state) [7]. The shape of the nanoparticles will depend on the ability of the extract to stabilize the nanoparticle [8].

2.2. Synthesis of nano-bio-materials using microorganisms

The biological synthesis of nanoparticles through microorganisms consists of taking target ions from their environment by microorganisms and converting them into metal ions through biomolecules such as enzymes, sugars, and proteins secreted by them [9]. Depending on the

location of nanoparticle synthesis, it can be classified as intracellular and extracellular synthesis [10,11]. The size and morphology of the nanoparticle depend on the microorganism and factors such as pH or temperature.

2.3. Synthesis of nano-bio-materials using biomolecules

In general, the main biomolecules used in the synthesis of nanoparticles are small molecules such as carbohydrates (e.g., glucose and galactose), amino acids, and short peptides used as reducers, allowing specific detection of the target [12,13]. This process depends on the ability of biomolecules to activate the development of nanoparticles [14, 15]. Several studies reported the use of monosaccharide (β -D-glucose) and a polysaccharide (soluble starch) for the synthesis of Ag and AuNPs [16].

3. Detection of heavy metals in water

Drinking water is a basic need in any country. Thus, rigorous monitoring of the presence of chemical contaminants such as heavy metals, toxins, and biological pollutants (microorganisms) generated by natural and human causes is required. Regarding the chemical contaminants in the environment, heavy metals such as Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , and Cr^{3+} , are commonly known for their association to health damage in humans, being extremely dangerous, even in low concentrations [1]. Furthermore, anionic heavy metals such as PO_4^{3-} , $C_2O_4^{2-}$, NO_3^- and SO_4^{2-} , are related to several diseases such as blue baby syndrome in children (the consequence of the high concentration of nitrate in the blood) and fluorosis (the consequence of the high concentration of fluoride) [1,17]. Among the existing solutions to solve this type of problem are chemical and physical methods. Chemical methods use toxic substances in their synthesis, and the formation of by-products can have harmful effects on the environment. On the other hand, physical processes (i.e., lithography, laser ablation) require a large amount of energy, so it is essential to mention that these methods can be highly expensive. However, the limitations of such methods can be effectively controlled by biological processes, such as using enzyme based strategies [17,18]. Heavy metals

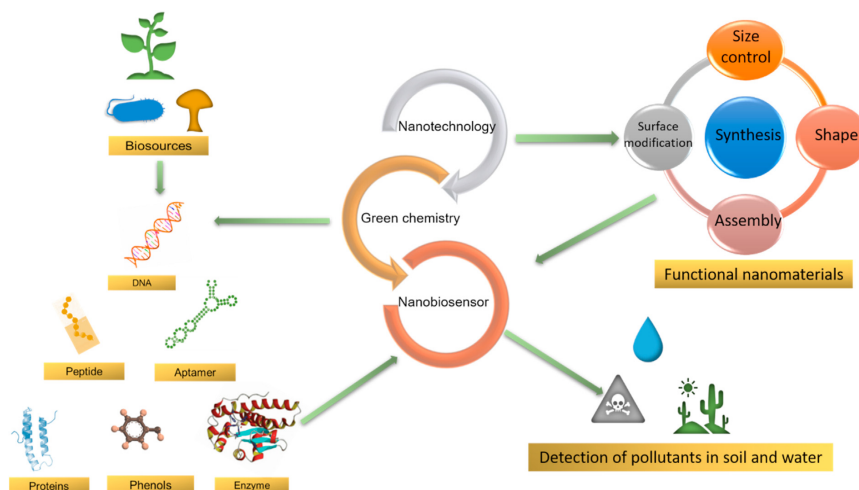


Fig. 1. Schematic representation of the synergy of nanotechnology and green chemistry for the development of nano-bio-sensors for the detection of pollutants in soil and water matrices. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 2

Nano-biomaterials for environmental diagnosis and limit concentration of detection of heavy metals in water.

Bio element	Nanostructured material	Identified metals	Detection limit	Reference
<i>Azadirachta indica</i>	AgNPs	Cu ²⁺	10 ⁻¹³ mol/L	[34]
<i>Baccaurea ramiflora</i>	AgNPs	Hg ²⁺	μM level	[24]
<i>Xanthoceras sorbifolia</i>	AuNPs	Cr ³⁺	3 μM	[27]
<i>Anacardium occidentale</i> (Leaves)	AuNPs	Cr ³⁺ y Cr ⁶⁺	1 μM	[35]
<i>Citrus limon</i> and <i>Citrus limetta</i>	AuNPs, AgNPs	Hg ²⁺	μM level	[36]
Dopamine	AgNPs	Cu ²⁺	μM level	[37]
GSH	AgNPs, AuNPs	Pb ²⁺	0,0001 ppm	[38,39]
PGA	AuNPs	Hg ²⁺	1.9 nM	[40]
GA	AuNPs	Pb ²⁺	5 μM	[41]
Peptide	AuNPs	Pt ²⁺ , Pd ²⁺ , Co ²⁺ and Pb ²⁺	μM level	[19]

can be considered as a group of chemical elements, not biodegradable, capable of accumulating in the food chain and seriously altering the environment, as well as human health. Because of that, the development of sensor frameworks that enable *in situ* control of harmful metal ions (e.g., Pb²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, and Se²⁺) in industrial waste and wastewater has gained attention in the field of nano-bio-sensors. Colorimetric sensors based on Au and Ag NPs coupled with biomolecules are currently being developed due to their simplicity, relatively low price, real-time detection of the target, and safety. Here, we report some designs presently used for the selective detection and quantification of metal ions. Table 2 summarizes various nano-biomaterials for environmental diagnosis and limit concentration of detection of heavy metals in water.

3.1. Detection of Pt²⁺, Pd²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, and Hg²⁺

A study for detection of metal ions by using peptide-AuNPs probes reported the high selectivity of various metal ions (Pt²⁺, Pd²⁺, Co²⁺, and Pb²⁺) except on ionic mercury (Hg²⁺) aiding the use of Flg-A3 fusion peptide (-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Lys-Pro-Ala-Tyr-Ser-Gly-Pro-Ala-Pro-Pro-Met-Pro-Pro-Phe-) as a multifunctional agent. In this method, A3 (AYSSGPAPMPPF) was used for synthesis and stabilization of AuNP from an aqueous solution of tetrachloroauric (HAuCl₄). Simultaneously, the N-terminal region of the peptide (-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Lys-) allowed the formation of complexes with metal ions by non-covalent interactions [19].

3.2. Detection of ionic mercury (Hg²⁺)

The presence of high amounts of ionic mercury in edible products has been associated with severe health problems such as sensory, motor, and neurological damage. Previous studies have reported that ionic mercury is converted to methylmercury by microorganisms when released into the sea [16,20]. Indeed, mercury (Hg) is a heavy metal highly present in the environment. It has natural sources (e.g., volcanic eruptions, forest fires, etc.) and anthropogenic sources (e.g., coal combustion, waste treatment, etc.). Exist different forms of mercury present in nature, for instance, elemental mercury (Hg⁰), ionic mercury (Hg⁺, Hg²⁺), and methylated mercury (monomethyl mercury CH₃Hg⁺, dimethylmercury (CH₃)₂Hg), being methylated mercury the most common form present in nature and living organisms. Previous studies reported that the strong binding interactions between dissolved organic matter and Hg promote the migration of Hg from contaminated soils and sediments to streams, lakes, and groundwater, thus entering the human food chain via the

Table 3

Nano-biomaterials for environmental diagnosis and limit concentration of detection of pollutants in soil.

Bio element	Nanostructured material	Pollutant	Detection limit	Reference
Lipase	Nano gel	Nitrofen	0.46 μM	[31]
DNA	Cu ₂ O-GS	PAHs	0.1–10 μM	[32]
AChE	3DG-CuO NFs	OP	0.92 μM	[6]
L cysteine	AuNPs	Cd ²⁺ and Pb ²⁺	18.5 nmol L ⁻¹ and 25.6 nmol L ⁻¹	[42]
Methemoglobin	NBLM	Soil extracts and nitrites	1 ppm	[43]
AChE	s-SWCNTs/BSA nanocomposites	MP	3.75 × 10 ⁻¹¹ M	[44]
GR-5 DNzyme	GO assisted Au NPs	Lead ions	0.05 nM	[45]
AP-algae	Flower shaped ZnO NPs	Chlorpyrifos	10 ⁻⁹ M	[46]
Anti-PCB77 aptamer	Thionine- MoS ₂ -rGO nanohybrid	PCBs	80 ag mL ⁻¹	[47]
Laccase	Fe ₃ O ₄ -Au core-shell NPs	Catechol	2 μM	[48]

consumption of plants, fish, and other living beings capable of accumulating the metal [21,22]. It is essential to mention that the different forms of Hg⁺ come from biotic intervention of anaerobic microorganisms and abiotic processes such as photomethylation or photodemethylation. According to Hongwei Luo et al. [23] the photochemical behavior of Hg includes photo-oxidation, photo-reduction, photochemical methylation, and photodegradation.

For targeted detection of Hg²⁺ ions, a colorimetric method described by Begum et al. consists of the combination of a nano-bio-material based on AgNP and the extract of *Baccaurea ramiflora*, associated as a green agent. The test involves the slow addition of nanoparticles to a solution containing ionic mercury and is carried out at room temperature in a wide pH range (3.73–11.18), and likewise, the presence of ionic mercury is revealed by a change in coloration [24].

3.3. Detection of ionic chromium (Cr³⁺) and manganese (Mn²⁺)

Consumption of ionic chromium in high concentration (>50–200 mg dl⁻¹) is related to mutation and cancer. It has been reported that Cr³⁺ and Mn²⁺ can enter to the environment by discharging effluents from chemical industries and steel workplaces [25]. One method for selective recognition of ionic chromium (Cr³⁺) is using AuNP stabilized by *Xanthoceras sorbifolia* extract (XT-AuNP) as a green agent. This method was described by Ha et al. and had a limit of detection of ionic chromium at concentrations of 3 μM [26]. Furthermore, the nano-bio-sensor was highly effective in the rapid detection of Cr³⁺ in biological and environmental analyses [27]. Another chromium detection method was developed by using the extract from fresh *Anacardium occidentale* leaves. The results confirmed that such a nano-bio-sensor was highly selective and sensitive to the presence of Cr⁶⁺ ions with a detection limit of 1 μM (Priyanka et al.). The test is carried out aiding the reduction of Cr⁶⁺ ions in Cr³⁺ by the secondary metabolites present in the extract. The detection of Cr³⁺ becomes evident due to a change in the coloration of the sample [28]. Another method of colorimetric detection for Cr³⁺ and Mn²⁺ ions was described by Priyanka et al., and consists of the use of Ag nanospheres (C-SNSs) synthesized at different pH values (4.5 and 11.5). The method is performed by adding a solution of C-SNSs in other solutions rich in Cr³⁺ ions at a pH of 4.5, where a color change from yellow to colorless may be observed as a positive revelation of Cr³⁺ ions. However, at pH 11.5, the addition of C-SNSs induces a color change from yellow to brown, thus, causing a morphology change from nanospheres to square pyrimity in the presence of Mn²⁺ ions. The minimum detection concentration of Cr³⁺ and Mn²⁺ is 0.20 μM [29].

4. Detection of pollutants in soil

The use of diverse nanomaterials (e.g., metal-based, composites, carbon-based, etc.) for agricultural proposes has been developed, aiming to minimize crop loss, to monitor climatic conditions, plant disease detection, and sensing plant metabolite and toxins in the soil. Nano sensing technologies, coupled with the employment of bio elements, represent an alternative to conventional methods for the detection of pesticides such as liquid gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC), electrophoresis, and mass spectroscopy [30]. The integration of these nanomaterials with bio elements allows the enhancement of selectivity, sensitivity, rapid inspection, and target recognition of pollutants in the soil, such as pesticides. Among the type of nano biosensors that have been reported in the literature, the development of enzyme (electrochemical and fluorescence detection technique), immuno (electrochemical and fluorescence detection technique), nucleic (electrochemical detection technique), and whole-cell (bacterial, fungal, and algal cell-based) have been reported as the most common nano-bio-sensors for pesticide detection [2]. A research study published by Cheng and coworkers [31] describes the development of hierarchical macro-microporous ZIF-8 nanostructures as nano-lipase carriers electrochemical detection of nitrogenous diphenyl ether pesticides (nitrofen). The ZIF-8 structures were used to encapsulate and to immobilize nano-*Burkholderia cepacia* lipase (nano BCL), this arrangement allowed to reach a high enzyme activity of 4.3778 U and to reuse at least 5 times for consecutive hydrolysis reaction. The nano-biosensor was tested in apricots and compared to chromatography methods. Among the advantages, the nano-biosensor exhibited a better linear range (0–114 μ M), a low limit of detection (0.46 μ M), and a reasonable recovery rate. Moreover, compared to conventional detection methods, the cost of production was lower, and the operation resulted in more convenience for the detection of nitrofen. Regarding the use of nucleic techniques, a study performed by Babolghani et al. reported the simulation and experimental analysis of a DNA/Cu₂O-GS nanostructure, which are to be used as DNA-based nano-sensors to detect polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [32]. PAHs have associated toxicity, mutagenicity, and carcinogenicity effects in living organisms and are representative pollutants of soil [33]. The simulation studies were calculated based on density functional theory (DFT). It was found that DNA/Cu₂O-GS nanostructure could be used as a field-effect transistor (FET) to detect PAHs. In this way, benzene, toluene, and naphthalene were tested to determine their current leakage, the sensitivity, and dynamic range of transistor for 0.1–10 μ M. The energy on Cu₂O-GS nanostructure was more than –0.8 eV, which was ten times higher than on GS. Table 3 summarizes various nano-biomaterials for environmental diagnosis and limit concentration of detection of pollutants in soil.

5. Concluding remarks and outlook

The development of greener technologies to detect toxic pollutants in soil and water represents a real challenge worldwide. Nanotechnology has been established to accomplish the aim of maintaining environmental sustainability. Fabrication, design, and functionalization of nanomaterials reduce waste generation and preserve eco-friendly synthesis techniques. The implementation of nano-bio-sensors to detect potential pollutants and toxic compounds such as heavy metals in water or pesticides in soil has revealed their high-performance and a vast number of desirable features such as high sensitivity, small size, cost-effectiveness, and easy portability. Moreover, their fabrication techniques based on green synthesis methods minimize adverse environmental impacts and become an exceptional tool for progress in the environmental research field. Despite, nano-bio-sensors have portrayed excellent performance and reliable data in terms of pollutant recognition. Additionally, companies and research groups involved in nano-biosensing innovations must plan public and occupational policies for safety management of nano-bio-materials aiding the performance of life

cycle analysis related to nature and external factors affecting the properties of the materials in question.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

The authors are grateful to their representative universities for providing the literature.

References

- [1] F.D. Guerra, M.F. Attia, D.C. Whitehead, F. Alexis, Nanotechnology for environmental remediation: materials and applications, *Molecules* 23 (7) (2018) 1–23.
- [2] K.M. Aguilar-Pérez, J.I. Avilés-Castrillo, G. Ruiz-Pulido, Nano-sorbent materials for pharmaceutical-based wastewater effluents-An overview, *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* (2020) 100028, <https://doi.org/10.1016/j.csee.2020.100028>.
- [3] T. Rasheed, A.A. Hassan, F. Kausar, F. Sher, M. Bilal, H.M. Iqbal, "Carbon nanotubes assisted analytical detection—Sensing/delivery cues for environmental and biomedical monitoring", *Trac. Trends Anal. Chem.* 132 (2020) 116066.
- [4] G. Hernandez-Vargas, J.E. Sosa-Hernández, S. Saldarriaga-Hernandez, A.M. Villalba-Rodríguez, R. Parra-Saldivar, H.M.N. Iqbal, Electrochemical biosensors: a solution to pollution detection with reference to environmental contaminants, *Biosensors* 8 (2) (2018) 29.
- [5] T. Rasheed, F. Nabeel, M. Adeel, K. Rizwan, M. Bilal, H.M.N. Iqbal, Carbon nanotubes-based cues: a pathway to future sensing and detection of hazardous pollutants, *J. Mol. Liq.* 292 (2019) 111425.
- [6] H.M.N. Iqbal, M. Bilal, Time to automate the microbial detection and identification: the status quo, *J. Pure Appl. Microbiol.* 14 (1) (2020), 01–03.
- [7] M.S. Akhtar, J. Panwar, Y.S. Yun, Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1 (6) (2013) 591–602.
- [8] M. Shah, D. Fawcett, S. Sharma, S.K. Tripathy, G.E.J. Poinern, Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities, *Materials* 8 (2015) 11.
- [9] S. Prabhu, E.K. Poulou, Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects, *Int. Nano Lett.* 2 (1) (2012) 1–10.
- [10] P. Arun, V. Shanmugaraju, J.R. Ramanujam, S.S. Prabhu, E. Kumaran, Biosynthesis of silver nanoparticles from *Corynebacterium* sp. and its antimicrobial activity, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 2 (3) (2013) 57–64.
- [11] R. Selvakumar, et al., As(V) removal using carbonized yeast cells containing silver nanoparticles, *Water Res.* 45 (2) (2011) 583–592.
- [12] Y.N. Tan, J.Y. Lee, D.L.C. Wang, Uncovering the design rules for peptide synthesis of metal nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (16) (2010) 5677–5686.
- [13] T. Kunoh, et al., Green synthesis of gold nanoparticles coupled with nucleic acid oxidation, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (1) (2018) 364–373.
- [14] S. Saha, A. Pal, S. Kundu, S. Basu, T. Pal, Photochemical green synthesis of calcium-alginate-stabilized Ag and Au nanoparticles and their catalytic application to 4-nitrophenol reduction, *Langmuir* 26 (4) (2010) 2885–2893.
- [15] A. Care, P.L. Bergquist, A. Sunna, Solid-binding peptides: smart tools for nanobiotechnology, *Trends Biotechnol.* 33 (5) (2015) 259–268.
- [16] Y. Jia, X. Yan, X. Guo, G. Zhou, P. Liu, Z. Li, One step preparation of peptide-coated gold nanoparticles with tunable size, *Materials* 12 (13) (2019) 1–12.
- [17] N. Kulkarni, U. Muddapur, Biosynthesis of metal nanoparticles: a review, *J. Nanotechnol.* 2014 (2014).
- [18] L. Parra-Arroyo, R. Parra-Saldivar, R.A. Ramirez-Mendoza, T. Keshavarz, H.M.N. Iqbal, "Laccase-Assisted cues: state-of-the-art analytical modalities for detection, quantification, and redefining "removal" of environmentally related contaminants of high concern", in: *Laccases in Bioremediation and Waste Valorisation*, Springer, Cham, 2020, pp. 173–190.
- [19] J.M. Slocik, M.O. Stone, R.R. Nair, Synthesis of gold nanoparticles using multifunctional peptides, *Small* 1 (11) (2005) 1048–1052.
- [20] C. Florina Andreescu, Neurotoxic effects of mercury exposure for dental workers - a literature review, *Dent. Oral Craniofacial Res.* 3 (4) (2017) 1–4.
- [21] H. Zhu, H. Zhong, J. Wu, Incorporating rice residues into paddy soils affects methylmercury accumulation in rice, *Chemosphere* 152 (2016) 259–264.
- [22] X. Zhang, et al., Probing the DOM-mediated photodegradation of methylmercury by using organic ligands with different molecular structures as the DOM model, *Water Res.* 138 (2018) 264–271.
- [23] H. Luo, Q. Cheng, X. Pan, Photochemical behaviors of mercury (Hg) species in aquatic systems: a systematic review on reaction process, mechanism, and influencing factor, *Sci. Total Environ.* 720 (2020) 137540.
- [24] M.N. Alam, A. Chatterjee, S. Das, S. Batuta, D. Mandal, N.A. Begum, "Burmese grape fruit juice can trigger the 'logic gate'-like colorimetric sensing behavior of Ag nanoparticles towards toxic metal ions, *RSC Adv.* 5 (30) (2015) 23419–23430.

- [25] F. Tanvir, A. Yagub, S. Tanvir, R. An, W.A. Anderson, Colorimetric detection of mercury ions in water with capped silver nanoprisms, *Materials* 12 (9) (2019) 1–12.
- [26] Y. Fan, Z. Liu, L. Wang, J. Zhan, Synthesis of starch-stabilized Ag nanoparticles and Hg²⁺ recognition in aqueous media, *Nanoscale Res. Lett.* 4 (10) (2009) 1230–1235.
- [27] W. Ha, J. Yu, R. Wang, J. Chen, Y.P. Shi, Green colorimetric assay for the selective detection of trivalent chromium based on Xanthoceras sorbifolia tannin attached to gold nanoparticles, *Anal. Methods* 6 (15) (2014) 5720–5726.
- [28] C.K. Balavigneswaran, T. Sujin Jeba Kumar, R. Moses Packiaraj, S. Prakash, Rapid detection of Cr(VI) by AgNPs probe produced by Anacardium occidentale fresh leaf extracts, *Appl. Nanosci.* 4 (3) (2014) 367–378.
- [29] P. Joshi, M. Nair, D. Kumar, PH-controlled sensitive and selective detection of Cr(III) and Mn(II) by using clove (*S. aromaticum*) reduced and stabilized silver nanospheres, *Anal. Methods* 8 (6) (2016) 1359–1366.
- [30] V. Kumar, K. Arora, Trends in nano-inspired biosensors for plants, *Mater. Sci. Energy Technol.* 3 (2020) 255–273.
- [31] Y. Cheng, et al., Hierarchical macro-microporous ZIF-8 nanostructures as efficient nano-lipase carriers for rapid and direct electrochemical detection of nitrogenous diphenyl ether pesticides, *Sensor. Actuator. B Chem.* 321 (February) (2020) 128477.
- [32] F. Mirzaili Babolghani, E. Mohammadi-Manesh, Simulation and experimental study of FET biosensor to detect polycyclic aromatic hydrocarbons, *Appl. Surf. Sci.* 488 (May) (2019) 662–670.
- [33] Sakshi S.K. Singh, A.K. Haritash, Polycyclic aromatic hydrocarbons: soil pollution and remediation, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 16 (10) (2019) 6489–6512.
- [34] I. V. Anambiga, V. Suganthan, N.A.N. Raj, T.S.S. Kumar, Colorimetric detection of lead ions using glutathione stabilized silver nanoparticles, *Int. J. Sci. Eng. Res.* 4 (5) (2013) 710–715.
- [35] R. Sukirtha, et al., Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model, *Process Biochem.* 47 (2) (2012) 273–279.
- [36] S.S. Ravi, L.R. Christena, N. Saisubramanian, S.P. Anthony, Green synthesized silver nanoparticles for selective colorimetric sensing of Hg²⁺ in aqueous solution at wide pH range, *Analyst* 138 (15) (2013) 4370–4377.
- [37] Y.R. Ma, H.Y. Niu, X. Le Zhang, Y.Q. Cai, Colorimetric detection of copper ions in tap water during the synthesis of silver/dopamine nanoparticles, *Chem. Commun.* 47 (47) (2011) 12643–12645.
- [38] V. Vinod Kumar, S.P. Anthony, Silver nanoparticles based selective colorimetric sensor for Cd²⁺, Hg²⁺ and Pb²⁺ ions: tuning sensitivity and selectivity using co-stabilizing agents, *Sensor. Actuator. B Chem.* 191 (2014) 31–36.
- [39] X. Mao, Z.P. Li, Z.Y. Tang, One pot synthesis of monodispersed L-glutathione stabilized gold nanoparticles for the detection of Pb²⁺ ions, *Front. Mater. Sci.* 5 (3) (2011) 322–328.
- [40] H. Guan, X. Liu, W. Wang, J. Liang, Direct colorimetric biosensing of mercury(II) ion based on aggregation of poly-(γ -glutamic acid)-functionalized gold nanoparticles, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 121 (2014) 527–532.
- [41] K. Yoosaf, B.I. Ipe, C.H. Suresh, K.G. Thomas, In situ synthesis of metal nanoparticles and selective naked-eye detection of lead ions from aqueous media, *J. Phys. Chem. C* 111 (34) (2007) 12839–12847.
- [42] X. Wang, et al., A living plant cell-based biosensor for real-time monitoring invisible damage of plant cells under heavy metal stress, *Sci. Total Environ.* 697 (2019) 134097.
- [43] C.G. Siontorou, K.N. Georgopoulos, A biosensor platform for soil management: the case of nitrites, *J. Clean. Prod.* 111 (2016) 133–142.
- [44] T.H.V. Kumar, A.K. Sundramoorthy, Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites, *Anal. Chim. Acta* 1074 (2019) 131–141.
- [45] H.B. Wang, L.H. Ma, B.Y. Fang, Y. Di Zhao, X. Bin Hu, Graphene oxide-assisted Au nanoparticle strip biosensor based on GR-5 DNAzyme for rapid lead ion detection, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 169 (no. September) (2017) 305–312, 2018.
- [46] M. Pabbi, A. Kaur, S.K. Mittal, R. Jindal, A surface expressed alkaline phosphatase biosensor modified with flower shaped ZnO for the detection of chlorpyrifos, *Sensor. Actuator. B Chem.* 258 (2018) 215–227.
- [47] A. Mohammadi, E. Heydari-Bafrooei, M.M. Foroughi, M. Mohammadi, Electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of PCB77 using thionine-functionalized MoS₂-rGO nanohybrid, *Microchem. J.* 155 (2020) 104747. November 2019.
- [48] C. Karami, M.A. Taher, A catechol biosensor based on immobilizing laccase to Fe₃O₄@Au core-shell nanoparticles, *Int. J. Biol. Macromol.* 129 (2019) 84–90.

List of abbreviations

ACHE: Acetylcholinesterase
AP: Alkaline phosphatase
BSA: Bovine serum albumin
NPs: Nanoparticles
C-SNS: Silver nanospheres
DFT: Density functional theory
FET: Field effect transistor
GA: Gallic acid
GC: Liquid gas chromatography
3DG-CuO NFs: 3D graphene/copper oxide nano-flowers
GS: Graphene sheet
GSH: Glutathione
GO: Graphene oxide
HPLC: High-performance liquid chromatography
MP: Methyl Parathion
NBLM: Nano bilayer lipid membranes
OP: Organophosphate pesticides
PAHs: Polycyclic aromatic hydrocarbons
PCBs: Polychlorinated biphenyls
PGA: Polyglutamic acid
s-SWCNTs: Semiconducting single-walled carbon nanotubes